NAUNYN-SCHMIEDEBERGS

ARCHIV

FÜR

EXPERIMENTELLE PATHOLOGIE UND PHARMAKOLOGIE

UNTER MITWIRKUNG
DER DEUTSCHEN PHARMAKOLOGISCHEN GESELLSCHAFT

HERAUSGEGEBEN VON

DR. L. HEILMEYER
PROFESSOR DER INNEREN MEDIZIN
FREIBURG i. Br.

DR. W. HEUBNER
EM. PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
HEIDELBERG

DR. P. HOLTZ
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
FRANKFURT

DR. L. LENDLE
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
GÖTTINGEN

227. BAND

MIT 196 TEXTABBILDUNGEN

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1956

BOSTON
APR 26 1956
MEDICAL LIBRARY

Alle Rechte vorbehalten.
Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages
ist es auch nicht gestattet, einzelne Beiträge oder Teile daraus
auf photomechanischem Wege (Photokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.
Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg.
Printed in Germany

CATALOGUED
APR 26 1956
L. R. V.

BOSTON MEDICAL
MAY 12 1961
LIBRARY

Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH

Inhalt des 227. Bandes

Seite

Amiri, H., s. **von Bubnoff, M.,** und **J. Krieg**

Atanassowa, L., s. **Gotsev, T.**

Balzer, H., und **P. Holtz,** Beeinflussung der Wirkung biogener Amine durch Hemmung der Aminoxydase. Mit 7 Textabbildungen 547

Bammer, H., Der Einfluß von N-Acetylglutaminsäuredinitril auf Nervenzellen. (Kurze Mitteilung). Mit 1 Textabbildung 470

Bayerle, H., s. **Fischer, H.**

Bode, H., und **K. Greeff,** Über die Wirkung des Strophanthins auf die renale Kalium- und Natriumausscheidung bei Ratten. Mit 3 Textabbildungen. 436

Bohnstedt, R. M., und **W. Lanz,** Einwirkung des Megaphens auf allergische Phänomene im Tierexperiment. Mit 3 Textabbildungen 488

von Bubnoff, M., J. Krieg und **H. Amiri,** Über die Wirkung von k-Strophanthin am Herz-Lungen-Präparat der Ratte und des Meerschweinchens. Mit 3 Textabbildungen 111

Büttner, H., s. **Portwich, F.,** und **J. Paulini**

van Caneghem, P., R. Marx und **H. W. Spier,** Beziehungen zwischen Hyaluronidasehemmung und der anticoagulierenden Wirksamkeit von Heparinen und Heparinoiden. Mit 4 Textabbildungen 149

Ciglar, M., s. **Stern, P., A. Nikulin** und **A. Misirlija**

Creutzfeldt, W., und **E. Tecklenborg,** Experimentelle Untersuchungen zur Funktion der A-Zellen der Pankreasinseln und zur Glucagonwirkung. Mit 11 Textabbildungen 23

Czok, G., und **K. Lang,** Über einige Wirkungen von L-Glutaminsäure, D-Glutaminsäure und γ-Aminobuttersäure. Mit 3 Textabbildungen . . . 214

Deiniger, R., Über Wirkungsänderungen der Barbitursäuren durch Beeinflussung der Methylierungsvorgänge am Stickstoff in vivo. Mit 8 Textabbildungen 316

Demling, L., und **J. Zach,** Temperatur und Acidität des Magens bei lokaler Mangeldurchblutung. Mit 4 Textabbildungen 509

Dengler, H., Über einen reninartigen Wirkstoff in Arterienextrakten. Mit 5 Textabbildungen 481

Drenckhahn, F.-O., und **J. Meissner,** Autoradiographische Untersuchungen über die Lokalisation von $Na_2{}^{35}SO_4$ in der Meerschweinchenniere. Mit 8 Textabbildungen 444

Enenkel, H. J., s. **Pedal, H. W.**

Felix, W., Über den Einfluß des Carotissinus auf die Durchblutung des Skeletmuskels. Mit 5 Textabbildungen. 342

Filkuka, J., s. **Vlašin, Z.**

Fischer, H., und **H. Bayerle,** Über die Wirkung reiner Crataegus-Säuren. . 246

Friebel, F., und **H. Lüchtrath,** Zur Wirkung von Toluylendiisocyanat (Desmodur T) auf die Atemwege. Mit 8 Textabbildungen. 93

Göing, H., und **U. Hackenberg,** Zur Frage der Sensibilisierung des Herzvagus bei der anaphylaktischen Reaktion. Mit 1 Textabbildung. 259

Gotsev, T., und **L. Atanassowa,** Die Kreislaufwirkung der isotonischen und hypertonischen Lösungen. I. Mitteilung. Mit 5 Textabbildungen. . . . 400

Seite

Greeff, K., und **P. Holtz,** Über die Natur des Überträgerstoffes vagalmotorischer Magenerregungen. Mit 6 Textabbildungen 559

—, —, Untersuchungen am isolierten Vagus-Magenpräparat. Mit 9 Textabbildungen 427

—, s. **Bode, H.**

Haas, H., Octinum, Hydro-Octinum, Octinum D. Ein Beitrag zur Analyse des Wirkungsmechanismus. Mit 2 Textabbildungen 71

Hackenberg, U., s. **Göing, H.**

Hahn, F., und **A. Lange,** Versuche zur Isolierung von Rattenserum-Anaphylatoxin. Mit 1 Textabbildung 12

—, **A. Oberdorf** und **W. Rummel,** Über die Wirkung krampfhemmender Substanzen auf die elektrischen Erscheinungen im corticalen Strychnin-Focus. Mit 3 Textabbildungen 528

Halbach, H., Beziehungen zwischen mechanischen und chemischen Einwirkungen auf das überlebende Froschherz 293

v. Haxthausen, E., Die analgetische Wirkung des 4-Methyl-2-Amino-Pyridins (W 45 Raschig) 234

Heidenreich, O., und **L. Schmidt,** Die Beeinflussung der Coronardurchblutung durch blutdruckwirksame Drogen bei intracoronarer und intravenöser Injektion. Mit 5 Textabbildungen 250

Heim, F., und **U. Schlandt,** Der Einfluß intravenöser Dauerinfusionen von Arterenol und Pendiomid auf den Blutzucker, Sauerstoffverbrauch und Blutdruck der Katze 275

—, s. **Leuschner, F.,** und **A. Leuschner**

Heise, E. R., und **K. H. Kimbel,** Über den Verbleib von methyl-thioäthyl-2′-pentyl-thiobarbitursaurem Natrium im Rattenkörper. Mit 2 Textabbildungen 352

Herken, H., s. **Maibauer, D.**

Herz, A., Über die Wirkung von Flavon- und Cumarinabkömmlingen auf rote Blutkörperchen. Mit 6 Textabbildungen 328

Hille, H., H. Schaefer, H.-J. Teske und **K. E. Zipf,** Über Herz- und Kreislaufwirkung eines Crataegus-Wirkstoffes (Heptaoxyflavanglykosid). Mit 3 Textabbildungen 281

Hoefke, W., und **H. Lüllmann,** Der histochemische Nachweis von Cholinesterase im Hühneramnion 519

Höreth, W., Über die leistungssteigernde Wirkung des embryonalen Herzextraktes (Corhormon) bei Reisebrieftauben 177

zur Horst-Meyer, H., und **J. Potel,** Der Einfluß von Vitamin E, Methionin und Corhormon auf die experimentelle Meerschweinchentuberkulose . . 62

Holtz, P., und **E. Westermann,** Über die Dopadecarboxylase und Histidindecarboxylase des Nervengewebes. Mit 3 Textabbildungen 538

—, s. **Balzer, H.**

—, s. **Greeff, K.**

Junkmann, K., Über protahiert wirksame Corticoide. Mit 1 Textabbildung . 212

—, s. **Schenck, M.**

Kadatz, R., und **H. Klupp,** Die pharmakologischen Wirkungen des 2-(p-Butoxyphenyl)-2-(Tetrahydro-1,4-Oxazinomethyl)-Dioxolan-(1,3)-Methylbromids (Q 160). Mit 4 Textabbildungen 383

Kimbel, K. H., s. **Heise, E. R.**

Seite

Klimmer, O. R., Einfache Apparatur zur Konstanthaltung von Gaskonzentrationen bei toxikologischen Untersuchungen. Mit 2 Textabbildungen. 467

—, Experimentelle Untersuchungen über die Toxikologie insecticider chlorierter Kohlenwasserstoffe. I. Mit 6 Textabbildungen 183

von Klobusitzky, D., Über die Neutralisation des gerinnungsfördernden Schlangengiftenzyms durch Heparin 196

Klotzsche, C., Zur Frage der erhöhten Acetylcholinbildung im Gehirn nach langdauernder Glutaminsäurefütterung 409

Klupp, H., s. **Kadatz, R.**

Kobinger, W., s. **Werner, G., O. Kraupp** und **H. Stormann**

Koch, R., Zur Genese des durch Thioharnstoff und seine Derivate ausgelösten Lungenödems (Pneumonose) 239

Kraupp, O., s. **Werner, G., W. Kobinger** und **H. Stormann**

Krieg, J., s. **von Bubnoff, M.,** und **H. Amiri**

Krüskemper, H.-L., und **G. Schulze,** Über das Verhalten von Lipiden und Fermenten in der Leber bei langdauernder Cholesterinfütterung. II. . . 161

Lang, K., s. **Czok, G.**

Lange, A., s. **Hahn, F.**

Langecker, H., 17-α-Oxyprogesteron und Nebennierenrindenhyperplasie. III. Mitteilung 474

Lanz, W., s. **Bohnstedt, R. M.**

Leuschner, A., s. **Leuschner, F.,** und **F. Heim**

Leuschner, F., A. Leuschner und **F. Heim,** Über die Bedeutung der Phenylisopropylamingruppe in einigen heterocyclischen Verbindungen. Mit 3 Textabbildungen 129

Lochner, W., H. Mercker und **E. Schürmeyer,** Die Wirkung von Adrenalin, Nor-Adrenalin, Acetylcholin und Vagusreizung auf die Sauerstoffsättigung des Blutes im Sinus coronarius, untersucht mit fortlaufender photometrischer Methode. Mit 8 Textabbildungen. 360

—, —, —, Die Wirkung vasoaktiver Pharmaka auf die Sauerstoffsättigung des Coronarsinusblutes. Mit 6 Textabbildungen. 373

Lüchtrath, H., s. **Friebel, F.**

Lüllmann, H., s. **Hoefke, W.**

Maibauer, D., und **H. Herken,** Vorkommen und Anreicherung von Inosit und Inositderivaten in den Zellfraktionen von Gehirn und Leber. Mit 3 Textabbildungen 456

Marx, R., s. **van Caneghem, P.,** und **H. W. Spier**

Meesmann, W., und **J. Schmier,** Kreislaufreaktionen im „Milz-Leber-Mechanismus" und nach Nor-Adrenalin. Mit 3 Textabbildungen . . . 265

Meissner, J., s. **Drenckhahn, F.-O.**

Mercker, H., s. **Lochner, W.,** und **E. Schürmeyer**

Milković, S., Z. Supek und **J. Taborsky,** Über den Einfluß des Ferro-Ions auf 5-Oxytryptaminwirkungen. Mit 3 Textabbildungen 221

Misirlija, A., s. **Stern, P., A. Nikulin** und **M. Ciglar**

Nikulin, A., s. **Stern, P., A. Misirlija** und **M. Ciglar**

Nöller, H. G., s. **Schreier, K.**

Oberdorf, A., s. **Hahn, F.,** und **W. Rummel**

Paulini, J., s. **Portwich, F.,** und **H. Büttner**

Seite

Pedal, H. W., und **H. J. Enenkel,** Über den Einfluß von Ephedrin, Pilocyrpin und Megaphen auf die Bildung des Diphtherie-Antitoxins beim Kaninchen. (Vegetatives Nervensystem und Immunität.) II. 142

Portwich, F., H. Büttner und **J. Paulini,** Über die Ausscheidung des 6-Sulfanilamido-2,4-dimethyl-pyrimidins und seines Acetylderivates durch die gesunde menschliche Niere 123

Potel, J., s. **zur Horst-Meyer, H.**

Reiter, M., Wirkung von Frequenz, Natriumentzug und Strophanthin auf Kontraktionskraft und Alkaligehalt des Herzmuskels. Mit 6 Textabbildungen 300

Rummel, W., s. **Hahn, F.,** und **A. Oberdorf**

Schaefer, H., s. **Hille, S., H.-J. Teske** und **K. E. Zipf**

Schenck, M., und **K. Junkmann,** Über protahiert wirksame Androgene. Mit 1 Textabbildung 210

Schlandt, U., s. **Heim, F.**

Schmidt, L., s. **Heidenreich, O.**

Schmier, J., s. **Meesmann, W.**

Schneider, W., Beitrag zum Testosteronstoffwechsel bei der Ratte. Mit 2 Textabbildungen 169

—, Die Wirkung von coffeinhaltigem Kaffee auf die Flimmerverschmelzungsfrequenz. Mit 2 Textabbildungen 393

Schreier, K., und **H. G. Nöller,** Stoffwechselversuche mit verschiedenen markierten Polyphosphaten. Mit 6 Textabbildungen. 199

Schümann, H. J., Nachweis von Oxytyramin (Dopamin) in sympathischen Nerven und Ganglien. Mit 7 Textabbildungen 566

Schürmeyer, E., s. **Lochner, W.,** und **H. Mercker**

Schulze, G., s. **Krüskemper, H.-L.**

Spier, H. W., s. **van Caneghem, P.,** und **R. Marx**

Stern, P., A. Nikulin, A. Misirlija und **M. Ciglar,** Histamin im Entzündungsprozeß. Mit 2 Textabbildungen. 522

Stormann, H., s. **Werner, G., O. Kraupp** und **W. Kobinger**

Supek, Z., s. **Milković, S.,** und **J. Taborsky**

Taborsky, J., s. **Milković, S.,** und **Z. Supek**

Tecklenborg, E., s. **Creutzfeldt, W.**

Teske, H.-J., s. **Hille, H., H. Schaefer** und **K. E. Zipf**

Vlašín, Z., und **J. Filkuka,** Beeinflussung der Streßantwort des Thymus und der Hibernationsdrüse der Ratte durch Veränderung der Reaktionslage des Nervensystems. Mit 4 Textabbildungen. 414

Vogt, W., Eigenschaften und Gewinnung von Darmstoffpräparaten. Mit 4 Textabbildungen 224

Werner, G., O. Kraupp, W. Kobinger und **H. Stormann,** Freisetzung von Kaliumionen aus innervierter und denervierter Skeletmuskulatur durch Tetramethylammoniumbromid. Mit 3 Textabbildungen 1

Westermann, E., s. **Holtz, P.**

Wilhelmi, G., Über die wachstums- und entzündungshemmenden Eigenschaften einiger Phenothiazine, Iminodobenzyle und Acridine. Mit 1 Textabbildung 497

Zach, J., s. **Demling, L.**

Zipf, K. E., s. **Hille, H., H. Schaefer** und **H.-J. Teske**

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 1—11 (1955)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. F. Brücke)

Freisetzung von Kaliumionen aus innervierter und denervierter Skeletmuskulatur durch Tetramethylammoniumbromid

Von
G. Werner, O. Kraupp, W. Kobinger und H. Stormann

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 17. Mai 1955)

Eine Freisetzung von Kaliumionen aus der Skeletmuskulatur wurde für eine Reihe von neuromuskulär lähmenden Verbindungen vom depolarisierenden Wirkungstypus nachgewiesen[11]. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Kaliumfreisetzung durch intraarteriell injiziertes ACh an der innervierten und chronisch denervierten Skeletmuskulatur einer genaueren quantitativen Analyse unterzogen[12]. Die dabei erhaltenen Ergebnisse ließen es von Interesse erscheinen, in derselben Versuchsanordnung das Verhalten einer Substanz zu untersuchen, die 1. weder durch die Cholinesterasen gespalten werden kann, noch eine Hemmwirkung auf die Cholinesterasen aufweist; 2. ein quartäres Stickstoffatom mit hoher Ladungsdichte besitzt und 3. eine möglichst einfache Molekularstruktur sowie geringes Molekulargewicht bzw. -volumen hat. Diese Bedingungen werden von dem Tetramethylammonium (TMA)-Ion erfüllt[2, 10].

Die depolarisierenden Eigenschaften von TMA wurden zunächst von Böhm[3] und Külz[14] an Hand der erregenden Wirkung auf die Froschmuskulatur sowie von Höber u. Wallenberg[9] durch Messung der Erniedrigung des „Ruhestromes" von isolierten Froschmuskeln festgestellt. An der Skeletmuskulatur von Warmblütern haben Dale u. Gasser[6] nach chronischer Denervierung eine Kontrakturwirkung von TMA beobachtet; an der innervierten Skeletmuskulatur von Warmblütern haben Bacq u. Brown[1] sowie Zaimis[16] erregende Wirkungen in Dosen von 0,5 mg nach intraarterieller Injektion beschrieben.

Methodik

Hintere Extremitäten von Katzen wurden in derselben Anordnung isoliert durchströmt, wie in einer vorangegangenen Mitteilung[12] beschrieben wurde. An jedem Tier war eine Extremität 9—16 Tage vor dem Durchströmungsversuch aseptisch durch Durchschneidung der Nn. ischiadicus und femoralis denerviert worden. TMA (Bromid)* wurde in drei Versuchen in Einzeldosen in einem Injektionsvolumen von 1 ml innerhalb einer Sekunde in den Zuführungsschlauch der

* Für die Überlassung von TMA-Bromid danken wir der Österreichischen Stickstoffwerke AG, Linz/Donau.

Aortenkanüle injiziert. In vier weiteren Versuchen wurden die Extremitäten für die Dauer von jeweils 15 min mit Lösungen verschiedener TMA-Konzentrationen durchströmt. Zu diesem Zwecke wurde TMA in der in der vorangegangenen Mitteilung[12] angegebenen Blut-Tyrode-Mischung in Konzentrationen von 10^{-6}—10^{-2} Mol/l gelöst. In den einzelnen Versuchen wurde zunächst mit den verdünnteren TMA-Lösungen begonnen und im weiteren Verlaufe die Konzentration von TMA nach jeder Durchströmungsperiode von 15 min Dauer durch Umschalten auf ein zweites Durchströmungsgefäß erhöht. Das ausströmende Blut wurde getrennt aus innervierter und denervierter Extremität in Sammelperioden von je 2 min Dauer aufgefangen und der Kaliumgehalt der einzelnen Proben in derselben Weise bestimmt wie in[12] angegeben wurde.

Versuchsergebnisse

A. Kaliumfreisetzung durch intraarterielle Einzelinjektionen von TMA

Nach Einzelinjektionen von TMA konnte an der innervierten Extremität bei einer Dosis von 0,36 μM bereits eine Freisetzung von 32 μM Kaliumionen aus der Muskulatur beobachtet werden; an der denervierten Extremität führten schon 0,031 μM TMA zu einer Freisetzung von 12,0 μM Kaliumionen. An beiden Extremitäten trat bei höheren Dosen eine zunehmend stärkere Freisetzung von Kaliumionen auf (Tab. 1).

Tabelle 1

Vers. Nr.	Den. Dauer in Tagen	Innervierte Extremität				Denervierte Extremität			
		Dosis TMA in μM	log Dosis	K μM Ausschüttung	Fluß cm³/min	Dosis TMA in μM	log Dosis	K μM Ausschüttung	Fluß cm³/min
KK 20	14	0,016	0,204—2	0	20	0,016	0,204—2	o	19,0
KK 20	14	0,033	0,518—2	0	19	0,031	0,490—2	12,0	18,5
KK 20	14	0,090	0,954—2	0	20	0,073	0,863—2	25,0	16,0
KK 20	14	0,36	0,556—1	32,0	19	0,280	0,447—1	44,0	16,0
KK 20	14	1,90	0,278	87,0	19	1,35	0,130	120,0	16,0
KK 20	14	6,65	0,823	192,0	17	6,35	0,803	329,0	16,0
KK 21	16	0,17	0,230—1	26,0	20	0,15	0,176—1	26,0	19,0
KK 21	16	0,67	0,826—1	41,0	20	0,62	0,792—1	85,0	18,0
KK 21	16	3,38	0,529	192,0	20	3,11	0,493	295,0	19,5
KK 26	9	0,45	0,653—1	51,0	23	0,5	0,698—1	45,0	27,0
KK 26	9	2,28	0,358	134,0	22	2,5	0,398	98,0	28,0
KK 26	9	4,47	0,650	160,0	28	3,17	0,502	180,0	26,0

Die in Tab. 1, Spalte 5 und 9 angegebenen Werte für die durch TMA zusätzlich aus der Muskulatur in Freiheit gesetzten Kaliumionen wurden auf folgende Weise berechnet (s. auch[12]): zunächst wurden die Differenzen zwischen den Kaliumkonzentrationen der jeweiligen auf die TMA-Injektion folgenden Sammelperioden und den Konzentrationen der Kontrollperioden vor und nach der Injektion bestimmt; diese Konzentrationsdifferenzen wurden mit dem Durchflußvolumen der zugehörigen Sammelperiode multipliziert und summiert.

In Vergleich zu den Versuchen mit ACh[12] war besonders auffallend, daß die Zeitdauer, während der eine zusätzliche Kaliumfreisetzung stattfand, nach Injektion von TMA bedeutend länger war. In Abb. 1a—c

ist der zeitliche Ablauf der über die Spontanfreisetzung hinaus erfolgten Abgabe von Kaliumionen nach Injektion von drei verschiedenen Dosen von TMA wiedergegeben; zum Vergleich sind in Abb. 1 d—f drei analoge Versuche mit ACh aus der von KRAUPP u. Mitarb.[12] durchgeführten Versuchsserie dargestellt. Aus dieser Gegenüberstellung geht hervor, daß in

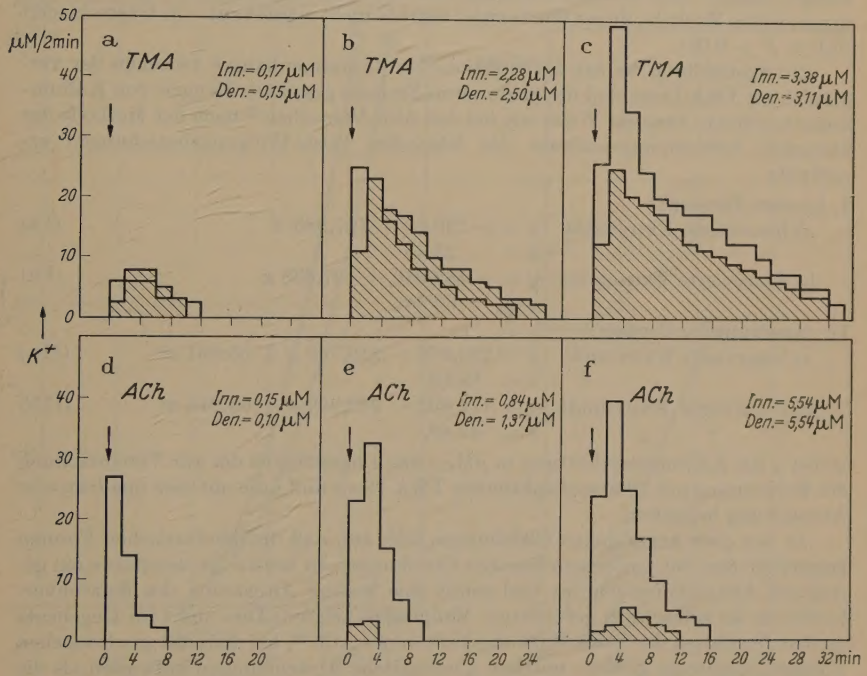


Abb. 1. Kaliumfreisetzung aus der innervierten und denervierten Muskulatur der hinteren Extremitäten von Katzen nach einmaligen intraarteriellen Injektionen von TMA und Azetylcholin (ACh). Ordinaten: Kaliumabgabe an die Durchströmungsflüssigkeit in µM/2 min. Abszisse: Zeit in Minuten. Bei ↓ : Zeitpunkt der TMA- bzw. ACh-Injektionen. Leer umrandete Felder: Ausschüttung aus der denervierten, schraffierte Felder: Ausschüttung aus der innervierten Muskulatur

Dosen gleicher Größenordnung die Kaliumausschüttung nach TMA-Injektionen ungefähr doppelt so lange andauert, als nach Injektionen von ACh; hierbei liegt das Maximum der Ausscheidung bei beiden Substanzen in der ersten bzw. zweiten Sammelperiode nach der Injektion, während der Unterschied vor allem in der verschiedenen Steilheit des Abklingens der Kaliumabgabe gelegen ist. Aus der Abb. 1 geht ferner hervor, daß zwischen der Kaliumfreisetzung aus innervierter und denervierter Extremität nach Injektion von TMA zunächst kein so deutlicher Unterschied besteht, wie dies bei ACh der Fall ist.

Zur genaueren Feststellung der Größe und Signifikanz eines eventuellen Unterschiedes der Menge des nach TMA aus innervierter und denervierter Extremität in Freiheit gesetzten Kaliums wurde mit den Werten der Spalten 4, 5, 8 und 9 der

Tab. 1 ein „t"-Test nach Student durchgeführt: hierzu war es zunächst notwendig zu zeigen, daß die mittlere Differenz an innervierter und denervierter Extremität einander entsprechenden Dosenpaare nicht signifikant von 0 unterschieden war; dies war mit einer Wahrscheinlichkeit $0{,}02 < P < 0{,}05$ statistisch zu sichern, so daß nunmehr der Student-Test auch für die Differenzen der Kaliumausschüttung an innervierter und denervierter Muskulatur durchgeführt werden konnte. Die Berechnungen ergaben eine mittlere Differenz von 27,83 μM Kaliumionen zugunsten des denervierten Muskels; dieser Wert erwies sich als nicht signifikant von 0 verschieden ($0{,}1 > P > 0{,}05$).

Zur Feststellung der Art des funktionellen Zusammenhanges zwischen der verabreichten TMA-Dosis und den dadurch in Freiheit gesetzten Mengen von Kaliumionen wurden in analoger Weise wie bei den ACh-Versuchen[12] nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate die folgenden Dosis-Wirkungsbeziehungen errechnet:

I. Lineare Formen:

a) innervierte Extremität $y = -230{,}90 + 107{,}983\ x$ (Ia)
$s = 23{,}85$

b) denervierte Extremität $y = -182{,}046 + 107{,}638\ x$ (Ib)
$s = 60{,}14.$

II. Quadratische Formen:

a) innervierte Extremität $y = 220{,}676 - 215{,}789\ x + 55{,}531\ x^2$ (IIa)
$s = 19{,}19,$

b) denervierte Extremität $y = 174{,}893 - 209{,}920\ x + 63{,}045\ x^2$ (IIb)
$s = 42{,}48,$

wobei y die Kaliumausschüttung in μM, x den Logarithmus der zur Vereinfachung der Berechnung mit 1000 multiplizierten TMA-Dosis und s die mittlere quadratische Abweichung bedeuten.

In den oben angeführten Gleichungen fällt auf, daß die quadratischen Formen gegenüber den dazugehörigen linearen Gleichungen an beiden Extremitäten ein geringeres Abweichungsquadrat und somit eine bessere Anpassung des Kurvenverlaufes an die tatsächlich gefundenen Meßpunkte zeigten. Dies steht im Gegensatz zu dem Verhalten der Dosis-Wirkungskurven des ACh[12], bei dem die quadratischen Formen durchwegs größere mittlere quadratische Abweichungen aufwiesen als die linearen Dosis-Wirkungsbeziehungen: Diese Werte betrugen in[12] für die innervierte Extremität: $s_{lin} = 17{,}07$; $s_{quadr} = 26{,}03$ bzw. für die denervierte Extremität: $s_{lin} = 34{,}37$; $s_{quadr} = 36{,}59$.

In Abb. 2 sind die nach Gleichung IIa bzw. IIb berechneten theoretischen Kurven II. Ordnung sowie die experimentell gefundenen Werte der Kaliumausschüttung nach verschiedenen TMA-Dosen (Tab. 1, Spalte 5 und 9) graphisch dargestellt. Aus der Abbildung geht hervor, daß im Bereich analytisch sicher nachweisbarer Kaliumausschüttungen die Kurve für die denervierte Muskulatur bei gleichen Dosen in Richtung höherer Ordinatenwerte (i.e. Kaliumabgabe) verschoben ist. Der Unterschied im Verlauf der beiden Kurven ist jedoch nicht als signifikant zu betrachten, da der früher durchgeführte Student-Test für die Differenzen der Kaliumabgabe einander zugehöriger Dosenpaare von TMA keine Signifikanz ergab; diese Aussage ist um so mehr zutreffend, als bei diesem Verfahren die durch die unterschiedliche Reaktionsweise der einzelnen Versuchstiere bedingte Streuung wegfällt.

B. Kaliumfreisetzung bei Durchströmung mit TMA-haltigen Lösungen

Bei Durchströmung mit Blut—Tyrode-Verdünnungen, denen TMA zugesetzt war, kam es bei Konzentrationen über $8 \cdot 10^{-6}$ Mol/l TMA an beiden Extremitäten zu einer meßbaren zusätzlichen Freisetzung von Kaliumionen an die Durchströmungsflüssigkeit. Die Kaliumabgabe setzte

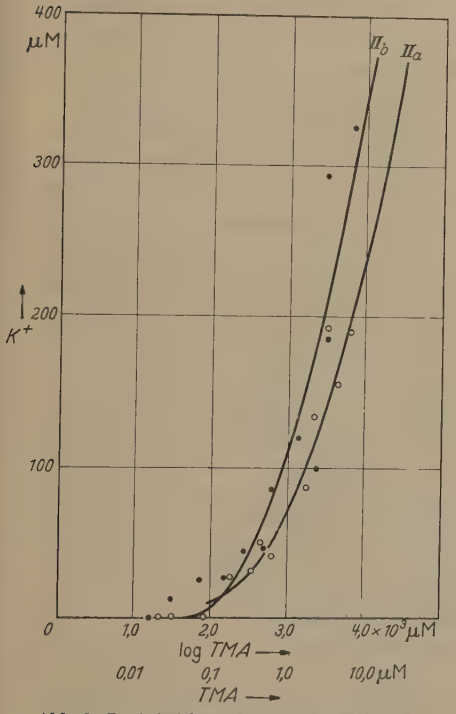


Abb. 2. Dosis-Wirkungskurven der Kaliumfreisetzung durch TMA an der innervierten (IIa) und denervierten (IIb) Skeletmuskulatur. Ausgefüllte Punkte: Denervierter Muskel; Kreise: innervierter Muskel. Ordinate: µM Kaliumionen; Abszisse: Logarithmen der TMA-Dosen in µM. Der Nullpunkt des Abszissenmaßstabes wurde zur Vereinfachung der statistischen Rechnungen bei log TMA 10^{-9} Mol angenommen

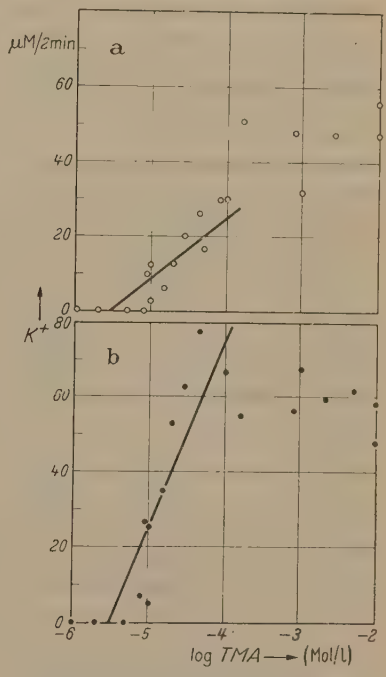


Abb. 3 a u. b. Kaliumfreisetzung aus der innervierten (3a) und denervierten (3b) Muskulatur der hinteren Extremitäten von Katzen bei Durchströmung mit Blut — Tyrode-Verdünnungen verschiedener TMA-Konzentrationen. Ordinaten: Kaliumausschüttung nach Erreichen eines zeitlich konstanten Maximalwertes in µM/2 min. Abszissen: Logarithmen der TMA-Konzentrationen in der Durchströmungsflüssigkeit

innerhalb der ersten 2 min nach Umschalten auf die TMA-haltige Lösung ein und erreichte nach 10 min einen Maximalwert, der bei weiterer Durchströmung beibehalten wurde; bei neuerlichem Umschalten auf eine stärkere TMA-Konzentration setzte sich auf die schon bestehende Kaliumausschüttung eine der Konzentrationserhöhung von TMA entsprechende zusätzliche Kaliumabgabe auf, wobei neuerlich innerhalb von 10 min ein Plateau der Kaliumausschüttung erreicht wurde. Wenn die Durchströmung anschließend wieder mit TMA-freier Blut — Tyrode-Lösung

fortgesetzt wurde, hielt die Kaliumausschüttung noch weiter an und zeigte innerhalb einer maximalen Beobachtungszeit von 15 min praktisch keine Veränderung. Die bei den einzelnen TMA-Konzentrationen sich einstellenden Maximalwerte der Kaliumausschüttung aus innervierter und denervierter Muskulatur sind in Abb. 3a bzw. 3b wiedergegeben.

Ein Vergleich der den Abbildungen 3a und 3b zugrunde liegenden Meßwerte ergibt folgende Unterschiede in den Konzentrations-Wirkungsbeziehungen des TMA an denervierter und innervierter Muskulatur: Am denervierten Muskel (Abb. 3b) tritt eine Abhängigkeit der zeitlich konstanten Maximalwerte der Kaliumfreisetzung von der verwendeten TMA-Konzentration in einem Bereich von $8 \cdot 10^{-6}$ bis etwa $4 \cdot 10^{-5}$ Mol/l in Erscheinung, während an der innervierten Extremität (Abb. 3a) eine Konzentrationsabhängigkeit in einem wesentlich größeren Bereich, nämlich bis etwa $5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l, besteht. An beiden Extremitäten wird schließlich derselbe Grenzwert der Kaliumausschüttung für hohe TMA-Konzentrationen (annähernd 60 μM K^+ pro 2 min) erreicht. Daraus geht hervor, daß die Steilheit der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen an innervierter und denervierter Muskulatur bis zum Erreichen des Grenzwertes der Kaliumausschüttung für hohe TMA-Konzentrationen verschieden ist. Dies ist auch unmittelbar aus den Abbildungen ersichtlich und wurde außerdem auf folgende Weise statistisch gesichert:

Es wurde für jede Extremität im Konzentrationsbereich von $8 \cdot 10^{-6}$ bis 10^{-4} Mol/l nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate die lineare Dosis-Wirkungsbeziehung errechnet und die Konfidenzintervalle der Steigungen nach dem in[12] näher angegebenen Verfahren bestimmt. Die Gleichungen der in Abb. 3a und 3b eingezeichneten Konzentrations-Wirkungsgeraden lauten:

$$\text{Innervierte Extremität} \quad \begin{aligned} y &= 89{,}629 + 16{,}078\, x \\ r &= 0{,}869; \end{aligned} \qquad \text{(IIIa)}$$

$$\text{Denervierte Extremität} \quad \begin{aligned} y &= 272{,}969 + 49{,}716\, x \\ r &= 0{,}90. \end{aligned} \qquad \text{(IIIb)}$$

(y = Abgabe von Kalium in μM pro 2 min nach Erreichen des zeitlich konstanten Maximums bei Durchströmung; x = Logarithmus der TMA-Konzentration in Mol/l; r = Korrelationskoeffizient.)

Die Konfidenzintervalle der Steigungen (β) betragen für Gleichung IIIa: $7{,}125 < \beta < 25{,}031$ und für Gleichung IIIb: $34{,}892 < \beta < 64{,}540$. Es geht daraus hervor, daß die Steilheit der Konzentrationsabhängigkeit der Kaliumausschüttung im Dosenbereich von $8 \cdot 10^{-6}$ bis 10^{-4} Mol/l TMA an innervierter und denervierter Extremität signifikant voneinander verschieden ist ($P = 0{,}05$).

Der Quotient aus dem Wert der TMA-Grenzkonzentration für die Kaliumfreisetzung bei Durchströmung und der in Versuchsreihe A bestimmten mittleren Grenzdosis der Kaliumfreisetzung durch TMA bei Einzelinjektionen liefert einen Umrechnungsfaktor (k), der die Bestimmung der am Wirkungsort erreichten maximalen Konzentrationen von TMA nach intraarterieller Injektion von Einzeldosen gestattet; der so bestimmte Wert von k beträgt rund 200.

Besprechung der Versuchsergebnisse

TMA führt ebenso wie andere depolarisierende Substanzen[11, 12, 15] zu einer Freisetzung von Kaliumionen aus innervierter und chronisch denervierter Skeletmuskulatur von Warmblütern.

Mit ACh[12] hatten wir zeigen können, daß die nach Einzelinjektionen auftretende Kaliumfreisetzung quantitativ befriedigend mit Hilfe der „Kurzschlußtheorie" von Fatt und Katz[7] zu beschreiben war. Nach dieser Theorie wurde in [12] die für eine hintere Extremität pro Sekunde zu erwartende Kaliumfreisetzung mit $2{,}7 \cdot 10^{-6}$ Mol/sec^{-1} berechnet. Daraus ergab sich für eine Depolarisationsdauer von 1 msec pro Endplatte ein Kaliumaustritt von $0{,}27 \cdot 10^{-14}$ Mol, während der aus elektrophysiologischen Messungen ermittelte Wert für den Gesamtionenfluß in der Anstiegsphase des Epp (etwa 1 msec) $3 \cdot 10^{-14}$ Mol beträgt. Unter der Annahme, daß rund ein Drittel des Epp-Stromes durch Kaliumionen transportiert wird, ergab sich damit eine befriedigende Übereinstimmung zwischen dem elektrophysiologisch bestimmten und dem in [12] berechneten sowie experimentell festgestellten Wert für den Kaliumdurchtritt durch die Endplatte nach ACh-Einwirkung.

Bei TMA beträgt der in Abschnitt B experimentell bestimmte Grenzwert der Kaliumausschüttung, der bei weiterer Erhöhung der TMA-Konzentration nicht mehr überschritten wird, $6 \cdot 10^{-5}$ Mol pro 2 min; unter der Annahme, daß der Kaliumaustritt auch bei TMA vorwiegend durch die Endplattenzone erfolgt, errechnet sich daraus ein Kaliumdurchtritt von $0{,}05 \cdot 10^{-14}$ Mol/msec und Endplatte. Dieser Wert ist nur sechsfach niedriger als derjenige, der auf Grund einer freien Diffusion von Kaliumionen durch die Endplattenzone bei Vorliegen eines „Kurzschlusses" durch TMA zu erwarten wäre.

Gegenüber ACh sowie den in [12] bei Annahme der Gültigkeit der Kurzschlußtheorie abgeleiteten Gesetzmäßigkeiten zeigt TMA insofern ein etwas abweichendes Verhalten, als die Dosis-Wirkungsbeziehung bei Einzelinjektionen von TMA im Grenzdosenbereich nicht linear verläuft. Dies dürfte damit zu erklären sein, daß im Bereich der Grenzkonzentrationen des TMA eine Abhängigkeit der pro Zeiteinheit erfolgenden Kaliumfreisetzung von der Höhe der TMA-Konzentration in Erscheinung tritt. In diesem Falle sind jedoch die Voraussetzungen für die Ableitung einer linearen log-Dosis-Wirkungskurve der Kaliumfreisetzung durch eine depolarisierende Substanz auf der Grundlage einer freien Diffusion von Kaliumionen durch die Endplatte für die Dauer der Kurzschlußdepolarisation nicht gegeben.

Weitere Unterschiede in der Wirkung des ACh und des TMA bestehen hinsichtlich der *Zeitdauer* der Kaliumausschüttung nach Verabreichung von Einzeldosen, der wirksamen *Grenzdosen* sowie der unterschiedlichen *Empfindlichkeit* von innervierter und denervierter Muskulatur.

1. Die Zeitdauer, während der nach Einzelinjektionen eine Kaliumfreisetzung aus der Muskulatur stattfindet, ist bei TMA unter Verwendung gleicher Dosen etwa doppelt so lang als bei ACh (s. Abb. 1a—f). Dies trifft in gleichem Maße für die innervierte wie für die denervierte Muskulatur zu. Dieses Verhalten kann auf keinen Fall durch eine längere

Verweildauer wirksamer TMA-Konzentrationen in der Durchströmungsbahn erklärt werden, da TMA eine kleinere Molekülgröße als ACh besitzt und unter gleichen Durchflußbedingungen (wie dies in den beiden Versuchsreihen der Fall war) zumindest ebenso rasch wie ACh aus den intra- bzw. extravasalen Anteilen der Extracellulärflüssigkeit verschwinden müßte. Es liegt nahe anzunehmen, daß TMA bei gleich langer Anwesenheit wirksamer Konzentrationen in der Extracellulärflüssigkeit länger an der Receptoroberfläche adsorbiert bleibt als ACh bzw. eine tiefer greifende Veränderung der Receptoren herbeiführt. Es ist dabei in Betracht zu ziehen, daß ACh an der Endplattenregion infolge seiner enzymatischen Spaltbarkeit kürzer einwirkt als TMA. Ob hier ausschließlich die Spaltung durch die Cholinesterasen maßgebend ist, erscheint allerdings fraglich, da in einer anderen Arbeit[13] gezeigt werden konnte, daß die durch ACh bewirkte Kaliumfreisetzung auch am vollständig eserinisierten Muskel kürzer andauert als nach TMA. Die Tatsache, daß die längere Wirkungsdauer von TMA auch am chronisch denervierten Muskel nachweisbar ist, spricht dafür, daß auch nach Degeneration der neuralen Anteile der Endplatte an den muskulären Anteilen ein enzymatischer Abbau von ACh stattfinden kann, wie dies für die fermentative hydrolytische Spaltung von Couteaux und Nachmanson[5] tatsächlich nachgewiesen wurde.

2. Die Grenzkonzentration für die Kaliumfreisetzung durch ACh liegt an der denervierten Muskulatur mit $3{,}5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l unter der von TMA ($8{,}0 \cdot 10^{-6}$ Mol/l), während an der innervierten Muskulatur die Grenzkonzentration für ACh ($4{,}2 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) bedeutend höher ist als der entsprechende Wert für TMA ($8{,}0 \cdot 10^{-6}$ Mol/l). Bei Verabreichung von Einzeldosen ruft ACh an der denervierten Extremität infolge seiner kleineren Grenzdosis zunächst eine stärkere Kaliumausschüttung als TMA hervor; wegen der größeren Steilheit der Dosis-Wirkungskurve verursacht jedoch TMA oberhalb einer Dosis von etwa $1{,}0 \cdot 10^{-6}$ Mol eine stärkere Kaliumausschüttung als ACh (Abb. 1 b, c und e, f). An der innervierten Muskulatur bewirkt TMA im gesamten untersuchten Dosenbereich eine bedeutend stärkere Kaliumfreisetzung als ACh.

3. Im Gegensatz zu ACh zeigt die Kaliumfreisetzung aus innervierter und denervierter Muskulatur nach Einzelinjektionen von TMA keinen statistisch signifikanten Unterschied. Die Annahme[12], daß die rund 100fach schwächere Empfindlichkeit der innervierten Muskulatur gegenüber der kaliumfreisetzenden Wirkung des ACh auf dem Vorhandensein einer Diffusionsschranke durch die neuralen Membranen der Endplattenkammer beruht, kann nur in der Form aufrecht erhalten werden, daß die neuralen Endplattenanteile gegenüber ACh eine besonders geringe Permeabilität besitzen. Möglicherweise findet beim Durchtritt des ACh durch diese Membranen bereits eine enzymatische Zerstörung vor Erreichen der spezifischen Receptoroberfläche statt.

Die hier mitgeteilten Befunde sind ein weiterer Beweis für die depolarisierende Wirkung des TMA-Ions, das auch auf Grund seiner übrigen pharmakologischen Wirkungen eindeutig in die von FLECKENSTEIN[8] aufgestellte Substanzklasse der „Katelektrotonica" einzureihen ist.

Diese Substanzen bewirken ähnlich der kathodischen elektrischen Depolarisation an der Außenseite erregbarer Membranen das Entstehen negativer Ladungen und damit ein Defizit an Gesamtmembranladung. Es besteht nun das Problem, auf welche Weise das von außen an die Membran herantretende stark positiv geladene TMA-Ion eine Negativierung der Membranaußenseite bzw. eine Herabsetzung des Membranpotentials hervorrufen kann. Es müßte dabei eine strukturelle Änderung der Membran in dem Sinne eintreten, daß das dem chemischen Potential der Kaliumionen zu beiden Seiten der Membran entgegengerichtete Membranpotential verringert wird und nunmehr Kaliumionen entsprechend den neuen Gleichgewichtsbedingungen durch die Membran austreten. Für quartäre Ammoniumionen besteht dabei die Möglichkeit, eine derartige Veränderung hervorzurufen darin, daß sie den Dissoziationsgrad an der Membranoberfläche verankerter undissoziierter Carboxyl- oder Phosphorsäuregruppen durch Salzbildung verändern. Hierbei wäre der Membranoberfläche die Struktur eines Kationenaustauschers (z. B. vom Carboxyltyp) zuzuordnen. Eine Veränderung des Dissoziationszustandes der Säuregruppen an der Membran durch Salzbildung mit TMA ist jedoch nur dann möglich, wenn im Zustand der physiologischen Polarisation ein Großteil dieser Säuregruppen in undissoziierter Form erhalten wird. Da unter den in der Extracellulärflüssigkeit vorherrschenden Wasserstoff- und Alkaliionenkonzentrationen der weitaus überwiegende Teil solcher Säuregruppen in dissoziierter Form vorliegen müßte, setzt eine solche Modellvorstellung voraus, daß durch einen aktiven Prozeß — etwa von der Art der Redox-Pumpe nach CONWAY[4] — durch Austausch von Alkali- gegen Wasserstoffionen ein undissoziierter Zustand der an der Membran verankerten Säuregruppen aufrecht erhalten wird. Es ist ferner erforderlich anzunehmen, daß dieser aktive Ionenaustauschmechanismus eine hohe Spezifität insofern besitzt, als quartäre Ammoniumgruppen von ihm nicht erfaßt werden, so daß diese entsprechend ihren Konzentrationen an der Membranoberfläche Salzbildung und damit Auftreten negativ geladener Säurerestionen unmittelbar an der Membranoberfläche bewirken können. Tatsächlich lassen die in Abb. 3a und 3b wiedergegebenen Versuchsergebnisse erkennen, daß zwischen den einwirkenden TMA-Konzentrationen und dem beobachteten Kaliumaustritt ein funktioneller Zusammenhang von ähnlicher Form wie bei Dissoziationsgleichgewichten besteht: die Funktion verläuft bei logarithmischer Darstellung der Konzentration auf der Abszisse im Bereich des steilsten Anstieges annähernd linear und strebt bei hohen TMA-Konzentrationen asymptotisch einen Grenzwert der Kaliumausschüttung zu.

Zusammenfassung

1. An isoliert durchströmten Hinterextremitäten von Katzen wurde die Abgabe von Kaliumionen aus der Muskulatur an die Durchströmungsflüssigkeit nach intraarteriellen Einzelinjektionen von Tetramethylammoniumbromid (TMA), sowie während und nach Durchströmung mit Blut—Tyrode-Verdünnungen verschiedenen TMA-Gehaltes bestimmt; die Versuche wurden vergleichend an normal innervierten sowie chronisch denervierten Extremitäten (9—16 Tage Intervall) durchgeführt.

2. Nach intraarteriellen Einzelinjektionen von TMA trat am denervierten Muskel ab einer Dosis von 0,03 μM TMA und am innervierten Muskel ab einer Dosis von 0,10 μM TMA eine deutlich nachweisbare Abgabe von Kaliumionen aus der Muskulatur auf. Höhere Dosen von TMA führten zu einer verstärkten Kaliumfreisetzung, wobei die log-Dosis-Wirkungskurven an beiden Extremitäten den experimentell gefundenen Werten besser durch eine quadratische als durch eine lineare Form angepaßt werden konnten.

3. Nach intraarteriellen Einzelinjektionen von TMA konnte kein signifikanter Unterschied im Verlauf und Größe der Kaliumfreisetzung aus der innervierten gegenüber der aus der denervierten Muskulatur festgestellt werden.

4. Die Zeitdauer der Kaliumabgabe aus der Muskulatur nach intraarteriellen Einzeldosen war bei TMA mehr als doppelt so lang wie nach Verabreichung gleicher Dosen von Azetylcholin.

5. Nach Durchströmung mit Blut—Tyrode-Verdünnungen verschiedenen TMA-Gehaltes trat ab einer Konzentration von $8{,}0 \cdot 10^{-6}$ Mol/l TMA an beiden Extremitäten eine Kaliumfreisetzung auf, die innerhalb von 10—15 min zu einem Maximum führte und von der TMA-Konzentration abhängig war. Die Konzentrations-Wirkungsbeziehung verlief an der denervierten Muskulatur signifikant steiler als an der innervierten Muskulatur, erreichte aber in beiden Fällen bei Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-3}$—$1 \cdot 10^{-2}$ Mol/1 TMA denselben Grenzwert ($60 \cdot 10^{-6}$ μM K^+/2 min).

Literatur

[1] Bacq, Z. M., and G. L. Brown: Pharmacological experiments on mammalian voluntary muscle, in relation to the theory of chemical transmission. J. of Physiol. **89**, 45 (1936). — [2] Barlow, R. B., and H. R. Ing: Curare like action of polymethylen-bis-quaternary ammonium salts. Brit. J. Pharmacol. **3**, 298 (1948). — [3] Böhm, R.: Über Wirkungen von Ammoniumbasen und Alkaloiden auf den Skeletmuskel. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **58**, 265 (1908). — [4] Conway, E. J.: Some aspects of ion transport through membranes; in: Active Transport and Secretion, Symp. Soc. exper. Biol. Nr. 8 (Cambridge Univ. Press, 1954). — [5] Couteaux, R., and D. Nachmansohn: Changes of cholinesterase at endplates of voluntary muscles following section of sciatic nerve. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **43**, 177 (1940). — [6] Dale, H. H. and H. S. Gasser: The pharmacology of denervated mammalian muscle Part I. The nature of the substances producing contracture. J. of Pharmacol **29**, 53 (1926). — [7] Fatt, P., and B. Katz: An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode. J. of Physiol. **115**, 320 (1951). — [8] Fleckenstein, A.: Elektrophysiologische Studien zum Mechanismus des Nervenblocks durch Schmerzstoffe und Lokalanästhetica. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 416 (1950). — [9] Höber, R., u. H. Wallenberg: Über den Einfluß von Salzen starker organischer Basen auf den Ruhestrom und die Erregbarkeit von Froschmuskeln. Pflügers Arch. **126**, 331 (1909). — [10] Holmes, P. E. B., D. J. Jenden and D. B. Taylor: Relationship between structure and action in drugs with curariform actions. Nature (Lond.) **159**, 86 (1947). — [11] Klupp, H., u. O. Kraupp: Über die

Freisetzung von Kalium aus der Muskulatur unter der Einwirkung einiger Muskelrelaxantien. Arch. internat. Pharmacodynamie **98**, 340 (1954). — [12] KRAUPP, O., G. WERNER, W. KOBINGER u. H. STORMANN: Freisetzung von Kaliumionen aus innervierter und denervierter Skeletmuskulatur durch intraarterielle Injektionenvon Azetylcholin. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 301—318 (1955). — [13] KRAUPP, O., G. WERNER, W. KOBINGER u. H. STORMANN: Über den Einfluß von Eserin und d-Tubocurarin auf die Freisetzung von Kaliumionen aus der Skeletmuskulatur durch Azetylcholin. Arch. exper. Path. u. Pharmakol., im Druck. — [14] KÜLZ, F.: Quantitative Untersuchungen über die Wirksamkeit homologer quartärer Ammoniumbasen. Arch. Physiol. (Bonn) **195**, 623 (1922). — [15] SOMOGYI, J. C., u. F. VERZAR: Die Wirkung von Azetylcholin auf das Kalium des quergestreiften Muskels beim normalen und adrenalektomierten Tier. Arch. internat. Pharmacodynamie **65**, 221 (1941). — [16] ZAIMIS, E. J.: The action of decamethonium on normal and denervated mammalian muscle. J. of Physiol. **112**, 176 (1951).

Prof. Dr. G. WERNER, Departamento da Farmacologia,
Faculdade de Medicina, Ribeirão Prêto, São Paulo, Brasilien

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 12—22 (1955)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. F. Hahn)

Versuche zur Isolierung von Rattenserum-Anaphylatoxin

Von
F. Hahn und A. Lange

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 1. August 1955)

Das Anaphylatoxinproblem wurzelt in der frühen Epoche der Anaphylaxieforschung, in der man die Entstehung des anaphylaktischen Giftes in die Blutbahn verlegte. Damals wiesen Friedemann sowie Friedberger nach, daß Serum bestimmter Tierarten (auch von Meerschweinchen) nach Berührung mit amboceptorbeladenen Erythrocyten oder Immunpräzipitäten bei Meerschweinchen toxische Erscheinungen nach Art der anaphylaktischen hervorruft. Die Ansicht von der Entstehung des Giftes, des sogenannten Anaphylatoxins, aus dem Antigen mußte zwar später fallen gelassen werden angesichts der zahlreichen Möglichkeiten der Anaphylatoxindarstellung, wobei auch sicher nicht antigene und chemisch relativ inerte Stoffe (Agar-Agar, Stärke, Inulin, Dextran, Kaolin, Bariumsulfat) die Rolle von „Kontaktsubstanzen" übernehmen können. Aber das grundsätzliche Interesse an diesem Erscheinungskomplex erlahmte erst, als die aufkommende celluläre Theorie der Anaphylaxie den Gedanken einer humoralen Giftentstehung überflüssig zu machen schien. Das Anaphylatoxin erwies sich überdies als nicht identisch mit Histamin, in dem man inzwischen das wahre Anaphylaxiegift zu erkennen glaubte.

Neuere Untersuchungen haben aber ergeben, daß das Anaphyltoxin über eine Histaminfreisetzung seine Wirkung entfaltet (Hahn u. Oberdorf; Hahn; Rocha e Silva, Aronson u. Bier; Rocha e Silva (1); Rocha e Silva u. Aronson). Sie wurden dadurch zum Anlaß, der Natur dieses rätselhaften Giftes und seiner Beziehungen zur Anaphylaxie erneut nachzugehen. Aller Wahrscheinlichkeit nach handelt es sich um einen Eiweißkörper (ältere Literatur bei Dörr); denn es ist nicht dialysierbar und nicht kochbeständig. Eine Fermentnatur wurde nicht erwiesen, die Beteiligung eines fermentativen Prozesses an seiner Entstehung aber nicht ausgeschlossen. Rocha e Silva (2) sucht das Gift wegen der Fällungsbedingungen (50—66% Alkohol bei —5 bis 0° C, 50—75%ig gesättigte Ammonsulfatlösung) in der Albuminfraktion.

Mit dem subtileren und schonenderen Cohnschen Verfahren der Eiweißfraktionierung sind auch wir dem Problem der Anreicherung oder Isolierung des Anaphylatoxins nähergetreten. Das Anaphylatoxin wurde mit Rattenserum, das hierzu am besten geeignet ist (Novy u. de Kruif; Rocha e Silva (1)), gewonnen. Es wurde mit Dextran, in einigen Versuchen mit Inulin, inkubiert, unter Verwertung unserer früheren Erfahrungen (Hahn u. Oberdorf; Hahn, Lange u. Giertz). Die anaphylatoxinhaltigen Sera und ihre Fraktionen wurden an Meerschweinchen intravenös getestet.

Die Cohnsche Methode — wir benutzten die Methode 10 — ist für menschliches Plasma ausgearbeitet worden. Die Übertragbarkeit auf Rattenplasma haben inzwischen Keltz u. Mehl untersucht und festgestellt, daß für die erste Trennungsstufe (Abtrennung der albuminfreien Fraktion I-II-III von der albuminhaltigen Fraktion IV-V-VI) keine Modifikation nötig ist. Die von ihnen vorgeschlagenen Änderungen zur Gewinnung des Albumins (Fraktion V) konnten von uns nicht mehr berücksichtigt werden, was aber für das Ergebnis unserer Versuche nicht wesentlich ist.

Wir verwendeten wie früher Serum statt Plasma. Zwar haben neuerdings Rothschild und Rocha e Silva die Eignung von Rattenplasma zur Anaphylatoxingewinnung bei Verwendung von Heparin als gerinnungshemmendes Mittel nachgewiesen. Aber nach unseren Erfahrungen erhält man dabei ein weniger wirksames Anaphylatoxin als mit Serum.

Methodik

1. *Gewinnung des Anaphylatoxins.* Rattenblut wurde durch Herzpunktion in Äthernarkose gewonnen. Nach 1½ Std Abtrennung des Blutkuchens durch Zentrifugieren bei 3000 Umdrehungen/min. Jede Serumcharge bestand aus Mischserum verschiedener Tiere. Ein Teil jeder Charge diente — nativ oder fraktioniert — als Kontrolle. Der Rest wurde zur Anaphylatoxinbildung verwendet.

Hierzu wurde zu 10 cm³ Serum 50 mg Dextran (partiell hydrolysiertes Macrodex mit Molekulargröße von durchschnittlich 80000) oder Inulin (Inulin album purissimum der Firma Merck), beide in Porzellantiegel feinst verrieben, gegeben. Das Gemisch und das Kontrollserum wurde dann für 1 Std im Brutschrank bei 37—38° unter mehrmaligem Aufrühren des Dextrans bzw. Inulins aufbewahrt. Abzentrifugieren bei 3000 Umdrehungen/min 20 min lang. Aufbewahrung vom Abguß und Kontrollserum im Eisschrank über Nacht.

2. *Fraktionierung des anaphylatoxinhaltigen Serums bzw. Kontrollserums nach der Methode 10 von* Cohn. Wir folgten bis auf einige zusätzliche Fällungsschritte der Originalvorschrift. Für das Arbeiten bei —5°C stand uns eine Kühltruhe „ATE" und eine Kühlzentrifuge MSE-London zur Verfügung[1]. Die exakte p_H-Einstellung geschah mit dem p_H-Meßgerät Metrohm[2].

[1] Die Anschaffung dieser Geräte wurde uns durch eine Unterstützung seitens des Kultusministeriums und des Sozialministeriums des Landes Nordrhein-Westfalen ermöglicht, wofür auch an dieser Stelle herzlichst gedankt sei.

[2] Für die Überlassung dieses Gerätes sei der Deutschen Forschungsgemeinschaft herzlichst gedankt.

Wegen des Alkoholgehaltes der Fällungs- und Extraktionsmittel mußten bei den einzelnen Trennstufen die in Lösung bleibenden Fraktionen nach Abtrennung von den gefällten Fraktionen noch zusätzlich präzipitiert werden, um injiziert werden zu können. Alle Niederschläge wurden in phosphatgepufferter NaCl-Lösung bei neutraler Reaktion gelöst.

Bei der Trennung von I-II-III und IV-V-VI fällt I-II-III aus und kann in NaCl gelöst werden. Aus der in Lösung befindlichen Fraktion IV-V-VI wurde IV-V ausgefällt, wobei VI in Lösung bleibt. VI wurde nach Abtrennung von IV-V nach

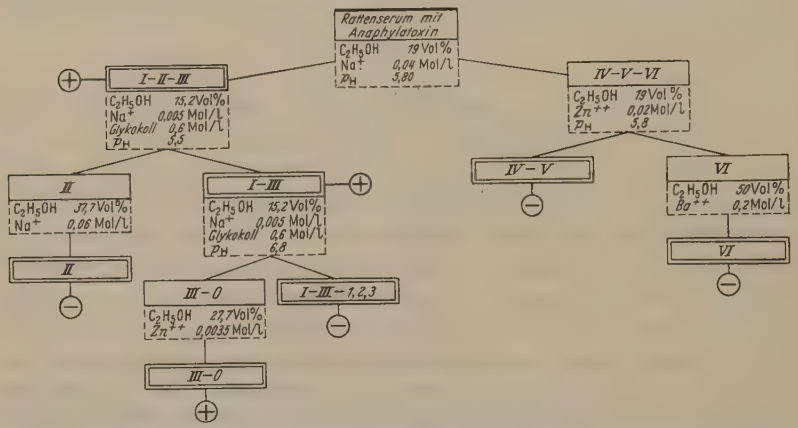


Abb. 1. Fraktionierung von anaphylatoxinhaltigem Rattenserum nach Cohn. Zeichenerklärung: ⊕ Anaphylatoxinhaltige Fraktion. ⊖ Anaphylatoxinfreie Fraktion. ▭ Gelöste Fraktion ▭ Gefällte Fraktion

einer Vorschrift von Lever u. Mitarb. mit 50 Vol% Alkohol und 0,2 Mol/l Barium^{++} ausgefällt. Beide Fraktionen wurden getrennt auf ihre Wirkung am Meerschweinchen geprüft.

Zur Zerlegung von IV-V in IV und V war Zugabe von etwas Zinkacetat nötig, damit die Fraktion IV ausgefällt bleibt. Dieser Zinkzusatz wird auch von Cohn erlaubt. Die gelöste Fraktion V wurde durch Erhöhung der Alkoholkonzentration nach Trennung von IV quantitativ präzipitiert.

Bei der Zerlegung von I-II-III in II und I-III fällt I-III aus. II mußte nach Abtrennung von I-III durch Erhöhung der Alkohol- und Natriumkonzentration nach einer Vorschrift von Lever gefällt werden.

Die Trennung von I-III in die gefällte Fraktion I-III-1,2,3 und die gelöste Fraktion III-0 folgte der Cohnschen Methode. Die Ausfällung der Fraktion III-0 gelang uns mit 27,7 Vol% Äthanol und 0,0035 Mol/l Zn^{++} quantitativ. Darüber hinausgehend zerlegten wir noch die Fraktion III-0 in zwei Unterfraktionen, indem wir die zur Ausfällung der gelösten Fraktion III-0 nötige Alkohol- und Zinkzugabe hintereinander erfolgen ließen und die beiden Präzipitate (von uns als III-O_Z und III-O_A bezeichnet) getrennt abzentrifugierten.

Die Zerlegung von I-III-1,2,3 in III-1,2 und I+III-3 erfolgte wieder nach Vorschrift. Die in Lösung bleibende Fraktion III-1,2 konnten wir durch Verschiebung des p_H auf 5,8 mit Acetatpuffer und Erhöhung des Alkoholgehaltes auf etwa 50 Vol% abscheiden.

3. *Testmethode.* Alle Sera und ihre Fraktionen wurden Meerschweinchen (150—200 g) in der früher beschriebenen Weise (Hahn u. Oberdorf) unter örtlicher Betäubung in die Vena Jugularis injiziert. Der typische Anaphylatoxinschock läuft

unter den Zeichen von Dyspnoe, Erstickungskrämpfen und schließlich Lähmung ab. Bei den gestorbenen Tieren findet sich autoptisch die charakteristische Lungenblähung, bisweilen mit Hämorrhagien durchsetzt. Abgesehen von dem klinischen Verlauf und dem autoptischen Befund bot die Kontrolle mit den nicht aktivierten Seren und ihren Fraktionen die Möglichkeit, den typischen Schockbefund vor Verwechslung mit anderen Reaktionen zu sichern.

Zur Auflösung der gefällten Fraktionen wurde soviel NaCl-Lösung verwendet, wie es der Ausgangsmenge des Serums entsprach.

Ergebnisse

Als wichtigstes Ergebnis unserer Versuche haben wir die Feststellung zu werten, daß eine Anaphylatoxinwirkung nur in der albuminfreien Fraktion I-II-III und deren Unterfraktionen I-III und schließlich nach deren Zerlegung in der Fraktion III-0 festzustellen war (Abb. 1).

Über die quantitativen Verhältnisse unterrichtet Tab. 1. Der erste Trennungsschritt bedingt eine Abnahme der Wirksamkeit in der gefällten Fraktion I-II-III auf etwa die Hälfte. Die Entfernung der Fraktion II aus dem I-II-III-Komplex führt zu keiner weiteren Wirkungsabnahme. Jedoch sinkt die Wirksamkeit nach der zusätzlichen Entfernung von I-III-1,2,3 weiter ab, so daß in der übrig bleibenden Fraktion III-0 die Wirksamkeit etwa $^1/_3$ der Ausgangswirkung beträgt.

Die abgetrennten Fraktionen II sowie I-III-1,2,3 erwiesen sich als anaphylatoxinfrei. Die tödliche Wirkung der letzteren hatte eine andere Ursache. Sie war auch bei der gleichen aus Kontrollserum hergestellten Fraktion vorhanden. Bei der Sektion der Tiere fanden sich massive Blutgerinnsel in den Venen und im re. Herzen, aber keine Zeichen von Lungenblähung.

Nach der Zerlegung von IV-V-VI in IV-V und VI führte die Fraktion IV-V ein nicht tödliches Lähmungsbild herbei, das aber auch bei den Kontrollen vorhanden war und mit aller Wahrscheinlichkeit auf die in der Fraktion vorhandenen Zinkionen zurückzuführen war. Die gleiche Wirkung war nach der Zerlegung von IV-V noch bei V vorhanden. Anaphylatoxinwirkungen fehlten bei all diesen Fraktionen sowie auch bei weiterer Zerlegung bei den Unterfraktionen IV-1 und IV-6,7.

Das eingangs beschriebene Verfahren erlaubte uns noch die Zerlegung der Fraktion III-0 in eine anaphylatoxinhaltige Fraktion III-O_Z und eine anaphylatoxinfreie Fraktion III-O_A. Die Wirksamkeit der Fraktion III-O_Z betrug nur noch die Hälfte derjenigen von III-0. Aber durch Kombination der getrennt gefällten Fraktionen in gemeinsamer Kochsalzlösung (III-O_{A+Z} in Tab. 1) war die Wirksamkeit der Fraktion III-0 nicht wieder herzustellen. Bei der stufenweisen Ausfällung der in III-0 enthaltenen Eiweißkörper spielen also offenbar Denaturierungsprozesse eine größere Rolle als bei der simultanen Ausfällung.

Da der erste Trennungsschritt, der das Anaphylatoxin von den albuminhaltigen Fraktionen abtrennt, von besonderer Wichtigkeit ist, prüften wir, ob der hierbei auftretende Wirkungsverlust durch Veränderung der Fällungsbedingungen vermindert werden könnte. Erhöhung der Alkoholkonzentration auf 25 und 30 Vol% führte aber zu keiner vermehrten Abscheidung von Anaphylatoxin. Senkung des

Tabelle 1. *Verhalten des Anaphylatoxins (Dextran-Rattenserumanaphylatoxin) bei der Fraktionierung des Serums nach* Cohn. *Prüfung am Meerschweinchen*

Fraktion	Rattenserum mit Dextran inkubiert					Rattenserum ohne Dextran inkubiert				
	Dosis cm³/100 g	Zahl der Versuche	davon mit Schock	davon letal	Emphysem	Dosis cm³/100 g	Zahl der Versuche	davon mit Schock	davon letal	Emphysem
nativ	0,25 0,5	7 29	7 29	2 29	2 29	4,0 = tödliche Dosis				
I-II-III	0,5	3	3	1	1	—	—	—	—	—
	1,0	2	2	2	2	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	2,0	3	0	0	0
II	1,5	1	0	0	0	—	—	—	—	—
	2,0	1	0	0	0	2,0	2	0	0	0
	3,0	1	0	0	0	—	—	—	—	—
	4,0	1	0	0	0	—	—	—	—	—
I-III	0,5	4	4	1	1	—	—	—	—	—
	1,0	5	5	5	5	—	—	—	—	—
	2,0	1	1	1	1	2,0	4	0	0	0
I-III,1,2,3	1,0	1	1	0	0	—	—	—	—	—
	1,5	1	1	0	0	—	—	—	—	—
	2,0	3	3	3	Embolie	2,0	3	3	3	Embolie
III-0	0,5	4	4	1	1	—	—	—	—	—
	1,0	4	4	3	3	—	—	—	—	—
	1,5	4	4	4	4	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	2,0	4	0	0	0
III-O_A *	2,0	2	0	0	0	2,0	1	0	0	0
	3,0	1	0	0	0	—	—	—	—	—
	4,0	3	0	0	0	4,0	2	0	0	0
III-O_Z *	1,0	1	1	0	0	—	—	—	—	—
	1,5	3	3	1	1	—	—	—	—	—
	2,0	10	8	3	3	2,0	2	0	0	0
	3,0	3	3	3	3	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	4,0	2	0	0	0
III-O_{A+Z} *	2,0	4	4	1	1	—	—	—	—	—
	3,0	2	2	2	2	—	—	—	—	—
IV-V	1,5	1	Lähmung	0	0	—	—	—	—	—
	2,0	2		0	0	2,0	2	Lähmung	0	0
	3,0	1		0	0	3,0	1		0	0
VI	2,0	2	0	0	0	2,0	1	0	0	0
	3,0	1	0	0	0	—	—	—	—	—

□ : anaphylatoxinhaltig

* : eigne Bezeichnung (siehe Text).

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Fraktion	Rattenserum mit Dextran inkubiert					Rattenserum ohne Dextran inkubiert				
	Dosis cm^3/100 g	Zahl der Versuche	davon mit Schock	davon letal	Emphysem	Dosis cm^3/100 g	Zahl der Versuche	davon mit Schock	davon letal	Emphysem
IV	1,0	1	0	0	0	—	—	—	—	—
	2,0	1	0	0	0	2,0	1	0	0	0
	3,0	3	0	0	0	—	—	—	—	—
	4,0	3	0	0	0	4,0	2	0	0	0
V	2,0	3	Lähmung	0	0	2,0	1	Lähmung	0	0
	3,0	1		0	0	—	—		—	—
IV-1	2,0	2	0	0	0	2,0	1	0	0	0
IV-6,7	2,0	2	0	0	0	2,0	1	0	0	0

p_H auf 5,0 schwächte die Wirkung der gefällten Fraktion ab, Steigerung des p_H auf 6,2 blieb ohne Einfluß.

Die anaphylatoxinhaltige Fraktion III-0 wurde schließlich noch in einer Gefriertrockenanlage getrocknet. Das erhaltene Pulver war nach Auflösung in Kochsalzlösung genau so toxisch wie die nicht getrocknete Fraktion. Die getrocknete Kontrollfraktion war wirkungslos. Die Trocknung der Fraktion III-0 bot die Möglichkeit, das anaphylatoxinhaltige Eiweiß in höherer Konzentration als im Ausgangsserum aufzulösen und somit die injizierten Flüssigkeitsmengen zu vermindern.

Mit der getrockneten Fraktion III-0 konnte auch gezeigt werden, daß die toxische Wirkung durch *Antihistaminschutz* genau so erlischt, wie die von nativem anaphylatoxinhaltigem Serum. 1 mg/kg Neoantergan subcutan schützte Meerschweinchen gegen eine sicher tödliche Dosis von III-0.

Auch nach Inkubation mit Inulin fand sich das Anaphylatoxin in der Fraktion III-0 wieder (Tab. 2). Die Wirksamkeit war die gleiche wie nach Inkubation mit Dextran. Nach früheren Versuchen (Hahn, Lange u. Giertz) verhalten sich die nativen Sera nach Inkubierung mit Dextran und Inulin ebenso. Inulin- und Dextrananaphylatoxin sind also wohl identisch.

Eiweißbestimmungen mit der Mikro-Kjeldahl-Methode ergaben, daß in der anaphylatoxinhaltigen Fraktion III-0 etwas weniger als $^1/_9$ der im Nativserum enthaltenen Eiweißmenge vorhanden war (Tab. 3). Da die Anaphylatoxinwirkung durch die Isolierung von III-0 nur auf $^1/_3$ fällt, so ist die spezifische, d. h. auf die Gewichtseinheit Eiweiß bezogene Wirksamkeit in der Fraktion III-0 gut 3mal größer als im Ausgangsserum.

Die geringe Erniedrigung des Gesamteiweißgehaltes im aktivierten Nativserum ist nicht signifikant. Der Reststickstoff weicht nicht von den Kontrollseren ab.

Es lag nahe, zu versuchen, ob sich durch Inkubation der isolierten Fraktion III-0 mit Dextran (50 mg zu 10 cm³ der in NaCl-Lösung aufgenommenen, aus 10 cm³ Serum stammenden Fraktion) Anaphylatoxin

Tabelle 2. *Nachweis von Inulin-Rattenserumanaphylatoxin in der Fraktion III-0 am Meerschweinchen*

Fraktion	Rattenserum mit Inulin inkubiert					Rattenserum ohne Inulin inkubiert				
	Dosis cm³/100 g	Zahl der Versuche	davon mit Schock	davon letal	Emphysem	Dosis cm³/100 g	Zahl der Versuche	davon mit Schock	davon letal	Emphysem
nativ	0,5	2	2	2	2	4,0 = tödliche Dosis				
II_I-0	0,5	3	3	1	1	0,5	1	0	0	0
	1,0	3	3	2	2	—	—	—	—	—
	1,5	3	3	3	3	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	2,0	1	0	0	0
	—	—	—	—	—	3,0	1	0	0	0

Tabelle 3. *Stickstoffbestimmung in anaphylatoxinhaltigem und -freiem Rattenserum und den Fraktionen III-0 und I-III-1,2,3*

Fraktion		Rattenserum mit Dextran inkubiert			Rattenserum ohne Dextran inkubiert		
		N (mg-%)	n	σ	N (mg-%)	n	σ
Rest-N (Nativserum)		51,3	19	± 8,84	54,0	16	± 9,58
Eiweiß-N:	Nativserum	874,0	19	± 111,0	925,0	16	± 85,3
	III-0	93,0	18	± 18,8	72,5	18	± 14,5
	I-III-1,2,3	186,6	10	± 11,9	209,7	10	± 5,2
	III-1,2	66,3	4	± 3,8	90,8	4	± 2,7
	I-III-3	127,1	4	± 4,3	123,1	4	± 3,8

erzeugen lasse. Dies war aber nicht der Fall (Tab. 4). Wir erhielten es jedoch durch Inkubation der nächst höheren Fraktion I-III. Die in dieser Stufe außer III-0 noch erhaltene Fraktion I-III-1,2,3 ergab für sich allein kein Anaphylatoxin, sondern erst in Kombination mit III-0. Für diesen Kombinationseffekt war die gesamte Fraktion I-III-1,2,3 nötig. Ihre Teilfraktionen waren in Verbindung mit III-0 unwirksam.

Die Stickstoff-Analyse (Tab. 3) ergab weiterhin, daß in der anaphylatoxinhaltigen Fraktion III-0 der Eiweißgehalt gegenüber der gleichen Fraktion aus nicht aktivierten Seren derselben Chargen signifikant erhöht war. Diesem Eiweißzuwachs entsprach ein Defizit in der Fraktion I-III-1,2,3 sowie in deren Unterfraktion III-1,2. Der N-Gehalt im Dextran (20 mg N/100 g Dextran) war zu niedrig, um den Eiweißzuwachs in

III-0 zu erklären. Hiernach ließ sich vermuten, daß das Prae-Anaphylatoxin ein in III-1,2 vorhandener Eiweißkörper ist, der durch seine Umwandlung in Anaphylatoxin so verändert wird, daß er unter den Bedingungen der Methode 10 in der Fraktion III-0 erscheint.

Diese Eiweißquote stellt nur etwa 2,7% des gesamten Serumeiweißes dar. Zukünftigen Isolierungsversuchen bietet sich somit die Aussicht, das Anaphylatoxin in einem noch höheren Reinheitsgrade als bisher zu gewinnen.

Tabelle 4. *Inkubierungsversuche mit Dextran an einzelnen Rattenserumfraktionen. Wirkung auf Meerschweinchen*

Fraktionen mit Dextran inkubiert	Dosis $cm^3/100$ g	Zahl der Versuche	davon mit Schock	davon letal	Emphysem
[I-III]	0,5	8	8	4	2
	1,0	8	8	7	3
III-0	1,0	2	0	0	0
	2,0	1	0	0	0
	3,0	3	0	0	0
	4,0	3	0	0	0
I-III-3	1,0	2	0	0	0
	2,0	1	0	0	0
III-1,2	1,0	2	0	0	0
	2,0	1	0	0	0
III-0 + I-III-3	1,0	1	0	0	0
	2,0	2	0	0	0
III-0 + III-1,2	1,0	2	1	1	Embolie
	2,0	1	0	0	0
I-III-3 + III-1,2	1,0	1	0	0	0
	2,0	2	1	1	Embolie
[III-0 + I-III-3 + III-1,2]	1,0	3	3	2	2
	2,0	2	2	2	2

[ ] : anaphylatoxinhaltig.

Die übrigen Faktoren der Fraktion I-III, soweit sie nicht die Matrix für das Anaphylatoxin darstellen, spielen vielleicht nur die Rolle von „Katalysatoren". Unveröffentlichte Befunde von Klein u. Lange, wonach die I-III-Fraktion die gesamten Teilstücke des Rattenserumkomplements enthält, lenkten unsere Aufmerksamkeit auf diese Serumfunktion. Nach der älteren Literatur soll bei der Anaphylatoxinbildung das Komplement inaktiviert werden. Für das Rattenserum trifft dies aber nach unseren Beobachtungen mit Dextran und Inulin nicht zu. Dies könnte bedeuten, daß im Rattenserum die die Anaphylatoxinbildung „katalysierenden" Komplementbestandteile überschüssig vorhanden sind. Wir haben daher geprüft, ob sich auch durch stark verdünntes

Rattenserum, das als Substrat für die Anaphylatoxinbildung nicht in Frage kommt, aber als Komplement im hämolytischen System noch wirkt, die Anaphylatoxinbildung in einer unverdünnten substrathaltigen,

Tabelle 5. *Anaphylatoxinbildung durch verdünntes Rattenserum allein und in Kombination mit der Fraktion I-III-1,2,3, III-0 oder III-1,2 (Inkubation mit Dextran). Testung am Meerschweinchen*

Je 10 cm³ unverdünntes, 2-, 4-, 8-, 16- und 20fach verdünntes Rattenserum wurden mit 50 mg Dextran inkubiert. In dem 20fach verdünnten Rattenserum wurden die präzipitierten Fraktionen in der Konzentration aufgelöst, mit der sie im unverdünnten Serum enthalten sind

Verdünnung des Rattenserums	zugesetzte Fraktion	Mit Dextran inkubiert					Ohne Dextran inkubiert				
		Dosis (cm³/100 g)	Zahl der Versuche	davon mit Schock	davon tödlich	Emphysem	Dosis (cm³/100 g)	Zahl der Versuche	davon mit Schock	davon tödlich	Emphysem
unverdünnt	—	0,25	3	3	1	1	—	—	—	—	—
		0,5	2	2	2	2	—	—	—	—	—
1/2	—	0,5	2	2	0	0	—	—	—	—	—
		1,0	2	2	2	2	—	—	—	—	—
1/4	—	1,0	2	2	1	1	—	—	—	—	—
		2,0	2	2	2	2	—	—	—	—	—
1/8	—	2,0	2	2	0	0	—	—	—	—	—
		4,0	2	2	1	1	—	—	—	—	—
1/16	—	4,0	2	2	0	0	—	—	—	—	—
		6,0	1	1	0	0	—	—	—	—	—
1/20	—	4,0	4	0	0	0	—	—	—	—	—
		6,0	3	0	0	0	—	—	—	—	—
1/20	I-III-1,2,3	0,5	6	6	2	2	—	—	—	—	—
		1,0	6	6	5	5	1,0	1	0	0	0
		—	—	—	—	—	2,0	1	0	0	0
		—	—	—	—	—	3,0	2	0	0	0
1/20	III-0	2,0	2	0	0	0	—	—	—	—	—
		3,0	1	0	0	0	—	—	—	—	—
		4,0	4	0	0	0	—	—	—	—	—
		6,0	1	0	0	0	—	—	—	—	—
1/20	III-1,2	1,0	1	1	0	0	—	—	—	—	—
		2,0	1	1	0	0	—	—	—	—	—
		3,0	2	2	0	0	3,0	2	0	0	0
		4,0	3	3	0	0	4,0	2	0	0	0
		—	—	—	—	—	5,0	2	0	0	0

zur selbständigen Anaphylatoxinbildung nicht befähigten Fraktion anregen lasse.

Wir lösten zu diesem Zweck in 20fach verdünntem Rattenserum die Fraktion I-III-1,2,3 entsprechend der Konzentration im unverdünnten Serum auf und inkubierten mit Dextran. Es bildete sich ein

Anaphylatoxin von der gleichen Wirkungsstärke wie nach Komplettierung der Fraktion I-III-1,2,3 durch die Fraktion III-0 in natürlicher Konzentration (Tab. 5). Mit der Fraktion III-0 gab das verdünnte Rattenserum kein Anaphylatoxin. Es fehlt eben hier das Substrat. Die Tab. 5 zeigt ferner, wie durch schrittweise Verdünnung von Rattenserum die Fähigkeit zur Anaphylatoxinbildung proportional dem Verdünnungsgrade abnimmt und als Folge der Substratausschaltung bei einer Verdünnung erlischt, bei dem die „katalytische" Wirkung gegenüber I-III-1,2,3 noch voll vorhanden ist.

Auch durch Zusatz von verdünntem Rattenserum zur Fraktion III-1,2, in der das Prae-Anaphylatoxin weiter eingeengt ist, ließ sich eine Anaphylatoxinbildung mit Dextran anregen. Die Wirksamkeit war aber nur schwach. Es kam zum schweren, aber zu keinem tödlichen Schock. Somit fehlen bei dieser starken Einengung des Substrates irgendwelche Faktoren, die durch das verdünnte Rattenserum nicht ausreichend gedeckt werden.

Da nach Tab. 1 durch Abscheidung von III-0 aus I-III in dem übrigbleibenden I-III-1,2,3 ein Gerinnungsfaktor aktiviert wird, der zu tödlichem Schock durch Lungenembolie ohne Lungenblähung führt, war bei der Sektion der in Tab. 5 als gestorben aufgeführten Tiere auf diesen Vorgang besonders zu achten. Es fehlten aber Blutgerinnsel in den Venen und im Herzen. Die Lungen waren typisch gebläht. Außerdem ergibt sich aus den Kontrollversuchen, daß $^1/_{20}$ Rattenserum die thrombotische Wirkung auch hoher Dosen von I-III-1,2,3 aufhebt. Es ist hierbei ineressant daß das verdünnte Rattenserum die Fraktion III-0 auch in dieser Hinsicht genau wie in den oben geschilderten Versuchen bei der Anaphylatoxinbildung vertreten kann.

Oncley u. Mitarb. fanden im menschlichen Plasma in der III-0-Fraktion ein Antithrombin, während die III-1,2-Fraktion bekanntlich Prothrombin enthält. Hierin könnte die Erklärung dafür liegen, daß nach Entfernung von III-0 die I-III-1,2,3-Fraktion Thrombosen und Embolien erzeugt. Zwei Beobachtungen in Tab. 5 sprechen dafür, daß die thrombotische Wirkung bei der Ratte speziell an die Fraktion III-1,2, die beim Menschen das Prothrombin enthält, gebunden ist. Unklar bleibt, warum hier in einem Versuch die Schutzwirkung von III-0 ausblieb.

Der Thrombosefaktor in I-III-1,2,3 hat sicher nichts mit der Matrix des Anaphylatoxins zu tun, da er nach der Inkubierung mit Dextran oder Inulin nicht in die III-0-Fraktion übergeht, sondern in der Fraktion I-III-1,2,3 nachweisbar bleibt (Tab. 1).

Über die Natur des Prae-Anaphylatoxins vermögen wir nichts zu sagen, solange uns die Zusammensetzung der mit der Cohnschen Methode aus Rattenserum isolierten Fraktionen noch unbekannt ist. Hierüber sollen uns weitere Untersuchungen Auskunft geben. Vorläufig steht nur fest, daß das Anaphylatoxin und die an seiner Bildung beteiligten Faktoren der Globulinfraktion angehören. Ob die genannten „katalytischen" Faktoren wirklich mit dem Komplement identisch sind und in welcher Weise sie in den Vorgang der Anaphylatoxinbildung eingreifen, ist bereits Gegenstand von Untersuchungen.

Zusammenfassung

1. Mit der Cohnschen Methode 10 konnte Dextran- und Inulin-Anaphylatoxin im Rattenserum in einer Fraktion nachgewiesen werden, die durch ihre Extraktionsbedingungen als III-0-Fraktion gekennzeichnet ist.

2. Stickstoffbestimmungen und Inkubationsversuche an einzelnen Globulinfraktionen ergaben, daß die Matrix des Anaphylatoxins in der auf Grund der Extraktionsmethode als I-III-1,2,3 zu bezeichnenden Fraktion, und zwar wahrscheinlich speziell in dem Teilstück III-1,2 enthalten ist.

3. An der Umwandlung des Prae-Anaphylatoxins in das Anaphylatoxin sind Bestandteile der gesamten I-III-Fraktion beteiligt, deren Wirkung katalytischen Charakter trägt und in Beziehung zur Komplementfunktion des Serums gebracht wird.

Literatur

Cohn, E. J., F. R. N. Gurd, D. M. Surgenor, B. A. Barnes, R. K. Bromn, G. Derouaux, J. M. Gillespie, F. W. Kahnt, W. F. Lever, C. H. Liu, D. Mittelman, R. F. Mouton, K. Schmid and E. Uroma: J. Amer. Chem. Soc. **72**, 465 (1950). — Dörr, H.: Handb. d. path. Mikroorganismen, Bd. 1, II. Teil, S. 881 bis 887 (1929). — Friedberger, E.: Z. Immun.forsch. **2**, 208 (1909). — Friedemann, U.: Z. Immun.forsch. **2**, 591 (1909). — Hahn, F.: Naturwissenschaften 1954, S. 465. — Hahn, F., u. A. Oberdorf: Z. Immun.forsch. **107**, 528 (1950). — Hahn, F., A. Lange u. H. Giertz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 603 (1954). — Keltz, A., and J. W. Mehl: J. Amer. Chem. Soc. **76**, 4004 (1954). — Lever, W. F., F. R. N. Gurd, E. Uroma, R. K. Brown, B. A. Barnes, K. Schmid and E. L. Schultz: J. Clin. Invest. **30**, 99 (1951). — Novy, F. G., and P. H. de Kruif: J. Inf. Dis. **20**, 589 (1917). — Oncley, J. L., M. Melin, D. A. Richert, J. W. Cameron and P. M. Gross, jr.: J. Amer. Chem. Soc. **71**, 541 (1949). — Rocha e Silva, M.: Brit. Med. J. **1952**, 779; Reações inesperades em Farmacologia. São Paulo 1952. S. 83—124. — Rocha e Silva, M., and M. Aronson: Brit. J. Exper. Path. **33**, 577 (1952). — Rocha e Silva, M., M. Aronson and O. G. Bier: Nature (Lond.) **168**, 465 (1951).

Prof. Dr. F. Hahn, Düsseldorf, Pharmakol. Inst. d. Med. Akademie

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 23—61 (1955)

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. L. Heilmeyer)

Experimentelle Untersuchungen zur Funktion der A-Zellen der Pankreasinseln und zur Glucagonwirkung*

Von
Werner Creutzfeldt und Erwin Tecklenborg

Mit 11 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. Juli 1955)

A. Einleitung und Fragestellung

In den letzten Jahren wurde wahrscheinlich gemacht, daß die A-Zellen der Pankreasinseln das hyperglykämisch-glykogenolytisch wirkende Glucagon bilden (Literatur in den zusammenfassenden Darstellungen von Ferner, 1952, de Duve, 1953, Pincus u. Rutmann, 1953, Kühnau, 1955). Über die Rolle des Glucagon unter physiologischen und pathologischen Bedingungen herrscht noch keine Klarheit. Während einige Autoren im Glucagon den eigentlichen Antagonisten des Insulin in der Blutzuckerregulation sehen und ihm eine wesentliche pathogenetische Bedeutung bei der Entstehung der diabetischen Hyperglykämie zusprechen (Ferner, 1951, de Duve, 1953, v. Holt, Kröner u. Kühnau, 1955) halten andere (Bürger, 1947, Pincus u. Rutman, 1953, Appel, Hansen u. Alslev, 1954, van Itallie, Morgan u. Dotti, 1955) es für einen Synergisten des Insulin, insofern als es die Leberglykogenvorräte für die Insulinwirkung in der Peripherie verfügbar macht. Im Gegensatz zu anderen hyperglykämisierenden Hormonen wie dem Adrenalin, dem STH, dem ACTH und dem Cortison hemmt Glucagon nicht die periphere Zuckerutilisation. (Appel, Hansen u. Alslev 1954, van Itallie, Morgan u. Dotti, 1955.)

Eine sichere diabetogene Wirkung des Glucagon konnte im Tierversuch noch nicht nachgewiesen werden. Bei der intakten Ratte führt das Hormon lediglich in Kombination mit Cortison zu Hyperglykämie und Glucosurie (Cavallero, Malandra u. Galansino, 1954). Nach Ingle, Beary u. Purmalis (1954) klingt die glucosuriesteigernde Wirkung eines in hohen Dosen mit intravenöser Dauertropfinfusion verabreichten hochgereinigten Glucagonpräparates bei teilpankreatektomierten

* Herrn Prof. Dr. med. H. G. Creutzfeldt zur Vollendung des 70. Lebensjahres gewidmet.

Ratten bereits nach 2 Tagen ab. Root (1954) konnte mit täglichen über 6 Monate verabfolgten hohen Glucagondosen bei Ratten und Kaninchen keine Blutzuckerveränderungen erzeugen. Die Insulinwirkung in Mäusekrampftest läßt sich durch Glucagon nicht beeinflussen (Root, Ellis u. Staub, 1954).

Ob beim menschlichen Diabetes mellitus tatsächlich eine relative oder absolute A-Zellvermehrung vorliegt, die ja als morphologisches Substrat eines Glucagon-Diabetes zu fordern wäre, ist nicht entschieden.

Die von Ferner (1942), Hess (1946) und Terbrüggen (1948) mit der Gros-Schultze-Versilberung erhobenen Befunde konnten nicht bestätigt werden (Creutzfeldt, 1953). Mit Granulafärbungen fand Gomori (1952) in 60% der Diabetiker eine normale A-B-Zellrelation. Seifert (1954) beobachtete außer bei Diabetikern bei zahlreichen anderen Krankheitsgruppen häufig eine A-Zellvermehrung. Er hält die A-B-Zellverschiebung für kein spezifisches Substrat des Diabetes mellitus, weil sie weder immer noch allein bei der Zuckerkrankheit vorhanden ist.

Neue Wege erschlossen sich jüngst der experimentellen Forschung durch die Auffindung verschiedener A-zellschädigender Substanzen. In Analogie zum Alloxanexperiment schien es möglich, die nach Zerstörung der A-Zellen auftretenden Ausfallserscheinungen zu studieren und auf einen Glucagonmangel zu beziehen, soweit nicht andere Stoffwechsel- und Organveränderungen diese verursachten.

1951 beschrieben van Campenhout und Cornelis eine Degranulation und Vakuolisation der A-Zellen beim Meerschweinchen nach Injektion von Kobaltchlorid. Vuylsteke, Cornelis und de Duve (1952) sowie Eser und Tüzünkam (1952) fanden den Glucagongehalt des Pankreas beim Meerschweinchen nach $CoCl_2$-Vergiftung herabgesetzt. Hypoglykämien traten nicht auf. Auf Grund des morphologischen Bildes und der langsamen Entstehung der A-Zellschädigung nach $CoCl_2$ beim Meerschweinchen nahmen Creutzfeldt und Schmidt (1954) eine sekundäre Degeneration der A-Zellen infolge abnormer Belastung an. Während diese Autoren beim Kaninchen nach $CoCl_2$ keine Inselveränderungen und keinen Einfluß auf den Alloxandiabetes sahen, fanden v. Holt und v. Holt (1954) nach Dauergaben von $CoCl_2$ und $CdSO_4$ bei Kaninchen eine Vermehrung der A-Zellen, was sie ebenfalls durch erhöhten Glucagonbedarf infolge der Vergiftung erklären. Im Gegensatz hierzu beschrieben Goldner, Volk und Lazarus (1952) auch bei Kaninchen nach $CoCl_2$ A-Zelldegenerationen, ohne daß dabei Hypoglykämien auftraten. Trotz Zerstörung der A-Zellen war eine Beeinflussung des Alloxandiabetes beim Kaninchen nicht nachzuweisen (Volk, Lazarus und Goldner, 1953). Beim Hund bewirkte $CoCl_2$ ebenfalls eine A-Zellzerstörung (Lazarus, Goldner und Volk, 1953), der Glucagongehalt des Pankreas blieb jedoch unverändert (Goldner, Volk und Lazarus, 1954). Diese Forschergruppe kommt auf Grund ihrer Kobaltversuche zu dem Schluß, daß die A-Zellen keine Rolle in der Blutzuckerhomöostase oder Glucagonproduktion spielen (Volk, Lazarus und Goldner, 1954).

Für diese These würden auch die neueren Untersuchungen von Raja Rama und De (1955) sprechen, die als Quelle des Glucagon das lymphatische Gewebe oder das Bindegewebe ansehen, weil sie den HGF aus Lymphknoten, Haut, Zunge und Milz darstellen konnten. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch die Beobachtung von Weitzel und Mitarbeiter (1953), daß die A-zellreichen Teleostierinseln kein Glucagon enthalten.

Nach diesen widersprechenden Ergebnissen verdiente die Beobachtung von Davis (1952), daß Synthalin A (Dekamethylendiguanidin) die A-Zellen zu schädigen vermag, besonderes Interesse. Denn diese Substanz ist hinsichtlich ihrer konstanten blutzuckersenkenden Wirkung seit Frank, Nothmann u. Wagner (1926) bekannt. Es erhob sich nun die Frage, ob die A-Zellschädigung als Ursache der Hypoglykämie oder als Folge der Synthalinintoxikation anzusehen ist. Das Kaninchenpankreas erwies sich nach Synthalinbehandlung jedenfalls als frei von Glucagon (Fodden u. Read, 1954). Während nun Davis (1952) offen läßt, ob die A-Zellschädigung nach Synthalin Folge einer Überanstrengung dieser Zellen ist, nehmen v. Holt, Kröner u. Kühnau (1954, 1955) an, daß Synthalin durch eine primäre A-Zellenzerstörung hypoglykämisch wirkt. Gegen diese These spricht die Tatsache, daß das Ausmaß der A-Zellschädigung in keiner Beziehung zur Schwere der Hypoglykämie nach Synthalin steht und daß die Synthalinhypoglykämie durch Glucagongaben nicht aufzuheben ist (Creutzfeldt u. Tecklenborg, 1955).

Schließlich lenkten v. Holt, Körner u. Kühnau (1954, 1955) noch die Aufmerksamkeit auf das nach den Beobachtungen von Janbon (1942) und Loubatières (1942) blutzuckersenkend wirkende p-Aminobenzosulfonamidisopropylthiodiazol, nach dessen Gabe sie A-Zellschädigungen fanden. v. Holt u. Mitarb. erklären die blutzuckersenkende Wirkung dieser Substanz ebenfalls mit einer A-Zellzerstörung. Sie konnten den Alloxandiabetes des Kaninchen durch Gaben des Sulfonamids günstig beeinflussen.

Im folgenden soll über eigene Experimente an Meerschweinchen, Kaninchen und Ratten berichtet werden, die den Mechanismus der A-Zellschädigung durch die genannten Substanzen klären und damit einen Beitrag zur A-Zellfunktion liefern sollten. Hierbei kamen normale und alloxandiabetische Tiere zur Verwendung. In der Annahme, daß zwischen A-Zellfunktion und Leberstoffwechsel ein enger Zusammenhang bestehe, wurde ferner die Wirkung verschiedener Lebergifte (Phosphor, Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform, Äthionin, Allylformiat) auf die A-Zellen geprüft. Verne (1949) sowie Verne u. Hébert (1951) beschrieben ja A-Zellveränderungen nach Leberschädigung durch Ammanita phalloides sowie Chloroform. Wir selbst konnten über A-Zellveränderungen nach Phosphor und Tetrachlorkohlenstoff berichten (Creutzfeldt, 1954). Außerdem wurde der Einfluß der skorbutischen Leberverfettung, des Penicillinstreß und der Insulinhypoglykämie auf die A-Zellen untersucht. Ferner prüften wir, ob gleichzeitige Glucagongaben die hypoglykämische oder die A-Zellen- und leberschädigende Wirkung der Gifte zu beeinflussen vermögen. Schließlich interessierten wir uns für die Frage, ob dem Glucagon eine lipotrope Wirkung eigen ist.

B. Untersuchungsgut und Methodik

Die Untersuchungen wurden an 136 (10 Kontrolltiere) 400—550 g schweren Meerschweinchen, 44 (5 Kontrolltiere) 1,5—2 kg schweren Kaninchen und 39 (6 Kontrolltiere) etwa 200 g schweren Albinoratten durchgeführt. Die Kaninchen und Meerschweinchen erhielten Rüben und Grünfutter, die Ratten Hafer und Brot. Die Blutzuckerbestimmung erfolgte nach der Methode von Hagedorn und Jensen (1923) nach Möglichkeit in Doppelbestimmungen. Das bei einem Teil der Versuche verwandte Glucagon ist ein hochgereinigtes amorphes Präparat der Firma Lilly & Co (Lot-Nr. 208—158 B—197)*. Verglichen mit kristallinem Glucagon enthält es 50% Substanz. 0,2 γ/kg des Präparates verursachen bei narkotisierten Katzen einen Blutzuckeranstieg um 30—40 mg-% nach 10—15 min. Der Insulingehalt ist minimal (0,005 –0,05 E/mg). Wir verabfolgten das Präparat in Glykokollpuffer von p_H 9. Die Wirksamkeit der Glucagonlösung wurde durch Kontrollversuche (intravenöse und intraperitoneale Applikation) laufend an gesunden Kaninchen überprüft.

Zur Prüfung einer eventuellen lipotropen Wirkung des Glucagon wurden die Gesamtlipoide der Leber gravimetrisch nach Extraktion mit Tetrahydrofuran bestimmt. — Zur Erzeugung eines Alloxandiabetes erhielten Kaninchen ein- bis zweimal 150 mg/kg Alloxan i.v. und Ratten 200 mg/kg Alloxan intraperitoneal. — Die Applikation und Dosis der Gifte wird in den einzelnen Abschnitten jeweils beschrieben**.

In den oben genannten Tierzahlen sind nicht die Tiere enthalten, die tot im Stall aufgefunden wurden. Diese wurden ausgeschieden, weil sie wegen der bekannten, schon nach wenigen Minuten auftretenden autolytischen Veränderungen an den Pankreasinseln für histologische Untersuchungen unbrauchbar waren. Spontan gestorbene Tiere wurden nur verwertet, wenn der Tod beobachtet und die Sektion momentan vorgenommen worden war. Die Tötung der Meerschweinchen erfolgte durch Nackenschlag, der Kaninchen durch Injektion von Luft in die Ohrvene und der Ratten durch Dekapitation mittels Scherenschlag.

Nach der Sektion sofortige Fixierung von Pankreas, Nebennieren und Leber in Bouinscher Flüssigkeit und 10%igem Formol. Die Leber wurde außerdem in Carnoyscher Flüssigkeit fixiert. In einer Reihe von Fällen kamen die Hypophyse, die Schilddrüse und die Niere zur Untersuchung. 10 μ dicke Gefrierschnitte von Pankreas, Leber und Nebenniere wurden mit Hämatoxylin-Sudan III nach Romeis (HS) gefärbt. Das übrige Material wurde in Paraffin eingebettet. Schnittdicke 3—5 μ. Färbungen: Hämatoxylin-Eosin (HE), Azan nach Heidenhayn, Azanmodifikation nach Gomori (1939), Chromhämatoxylinphloxinfärbung nach Gomori (1941), Glykogenfärbung nach Best. Während die Azanmodifikation nach Gomori in allen Fällen, in denen noch α-Granula vorhanden sind, eine sehr distinkte leuchtend rote A-Zelldarstellung gewährleistet, die sich insbesondere zu Auszählungszwecken bei Kaninchen eignet und bei diesem Tier der Chromhämatoxylinphloxinfärbung überlegen ist, ermöglicht letztere Färbung insbesondere in Fällen von A-Zelldegranulation beim Meerschweinchen noch eine sichere Abgrenzung der blassen degranulierten A-Zellen von den kräftig blau granulierten B-Zellen. Wir

---

* Herrn Dr. W. R. Kirtley von den Lilly-Research Laboratories (Indianapolis, USA) danken wir für die in großzügiger Weise zur Verfügung gestellte Substanz.

** Wir danken Herrn Prof. Dr. Dr. J. Kimmig für die Überlassung von IPTD, Herrn Prof. Dr. K. Junkmann (Schering AG, Berlin) für die Überlassung von Synthalin A und Allylformiat und der Deutschen Hoffmann-La Roche AG, Grenzach, für die Überlassung von Alloxan und Äthionin.

halten daher zur sicheren Beurteilung der Inselverhältnisse eine gleichzeitige Anwendung beider Methoden für notwendig. In Zweifelsfällen haben wir das Phasenkontrastverfahren zu Hilfe genommen.

Soweit Auszählungen der A-B-Zellenrelation vorgenommen wurden, erfolgte diese mit Hilfe eines Kreuztisches bei Ölimmersion (H.l. 100/Ok. 8 fach). Pro Tier wurden 2000 Inselzellen ausgezählt. Von weiteren quantitativen Erhebungen am Inselsystem wurde Abstand genommen, weil hierzu vollständige Schnittserien des gesamten Pankreas (Bargmann, 1939) unerläßlich sind.

C. Ergebnisse

Ausgehend von unseren Erfahrungen über die sehr unterschiedliche Wirkung des Kobaltchlorid auf die Pankreasinseln bei verschiedenen Nagetieren (Creutzfeldt u. Schmidt, 1954) erscheint es zweckmäßig, die Versuchsergebnisse getrennt nach Tierarten aufzuzeigen.

1. Meerschweinchenversuche

a) *Synthalinvergiftung.* Die Substanz wurde in wäßriger Lösung subcutan verabfolgt. Nach den Erfahrungen von Davis (1952) tritt eine hydropische Degeneration der A-Zellen beim Kaninchen frühestens nach 13 Std auf. Wählt man die Synthalindosis zu hoch, so kommt es zu tödlichen hypoglykämischen Schocks, bevor sich A-Zellveränderungen ausgebildet haben. Diese Beobachtung konnten wir beim Meerschweinchen bestätigen.

Wie aus Tab. 1 ersichtlich, ist die Dosis von 12 mg/kg zu hoch. Ein Tier starb bereits nach 4 Std im hypoglykämischen Schock. Das zweite Tier konnte durch intraperitoneale Glucosegaben (10%) 13 Std am Leben erhalten werden, wurde dann aber wegen ununterbrochener Krämpfe getötet. In beiden Fällen fehlten sichere A-Zellveränderungen. Mit 6 mg/kg Synthalin überlebten die Tiere etwas länger. Histologisch fand sich an den A-Zellen eine deutliche Degranulation. Eine Vakuolisation war eben angedeutet. Am günstigsten erwies sich die tägliche Injektion von 3 mg/kg Synthalin subcutan. Hierbei trat der tödliche Schock nach durchschnittlich $2^1/_2$ Tagen auf. Die A-Zellen waren in den meisten Fällen hochgradig bis vollständig degranuliert und vakuolisiert (Abb. 1). Eine vollständige Degranulation scheint jedoch nicht die Voraussetzung für die Vakuolisation der Zellen zu sein. Denn bisweilen sieht man am Rande der vakuolisierten Zellen oder in den zum Kern ziehenden Plasmafäden α-Granula. Entsprechend beobachtet man hochgradige Vakuolisation bei noch nicht vollständiger Degranulation (s. Tab. 1). Kernpyknosen oder Plasmahomogenisierungen von A-Zellen wurden nicht beobachtet, vielmehr sind die A-Zellkerne häufig sehr hell und chromatinarm, bisweilen vergrößert. Sehr selten sieht man karyolytische Vorgänge in vollständig vakuolisierten Zellen. In den meisten Fällen von kernlosen Vakuolen möchten wir annehmen, daß der Kern nicht in der Schnittebene liegt oder bei der Herstellung des Schnittes herausgefallen ist. Sowohl die degranulierten als auch die vakuolisierten A-Zellen erscheinen vergrößert und aufgequollen. Dadurch nehmen sie einen größeren Raum innerhalb

Tabelle 1. *Synthalinversuche an Meerschweinchen*

Tier Nr.	Tägliche Synthalindosis (mg/kg) s. c.	Versuchsdauer in Stunden bis zur Tötung* bzw. Tod im Schock	Blutzucker beim Tode (mg-%)	Schock	A-Zellen **	
					Degranulation	Vakuolisation
M 40	12	4	26	+	∅	∅
M 41	12	13×	36	+	(+)	∅
M 42	6	24	29	+	++	(+)
M 48	6	26	28	+	+(+)	(+)
M 43	6	31	30	+	+++	+
M 45	3	48	23	+	++++	+(+)
M 439	3	50	31	+	+++	+++
M 46	3	54×	23	+	+++	+(+)
M 47	3	54×	27	+	+++	+
M 416	3	57	26	+	+++	++++
M 417	3	57	23	+	++	++
M 418	3	58	29	+	++	+++
M 419	3	58	27	+	++	+++
M 53	1	52	21	+	∅	∅
M 64	1	75×	63	∅	++++	+(+)
M 62	1	85×	34	∅	++++	+
M 63	1	85×	79	∅	∅	∅
M 54	1	105	29	+	++++	++
M 55	1	120×	61	∅	+++	+
M 75	1	172×	49	∅	∅	∅
M 76	1	172×	63	∅	+	+
M 433	3	10	—	+	+	∅
M 434	3	18	22	+	+	(+)
M 447	3	31	23	+	++	++
M 446	3 + 3stündl.	31	21	+	+	+
M 448	3 10 γ Gluca-	36	29	+	+(+)	+
M 435	3 gon i.p.	48	36	+	+(+)	+(+)
M 436	3	50	27	+	+++	+++
M 437	3	50	29	+	+++	+++
M 438	3	63	56	+	+++	++

* × = getötet
** + = bis $^1/_3$ der
++ = bis $^2/_3$ der
+++ = über $^2/_3$ der
++++ = sämtliche
} A-Zellen degranuliert bzw. vakuolisiert.

des Inselgefüges ein als normalerweise, was eine A-Zellvermehrung vortäuscht. Da jedoch keine A-Zellmitosen anzutreffen sind, möchten wir eine echte A-Zellvermehrung ablehnen. Die B-Zellen sind meist auffallend klein. Ihre Kerne liegen dicht zusammengedrängt. Das Plasma zeigt in den Chromalaunpräparaten eine kräftige blaue Granulierung (Abb. 1). Nur in einem Fall fanden wir einzelne sicher degranulierte und vakuolisierte B-Zellen.

Die tägliche Dosis von 1 mg/kg Synthalin subcutan ergibt uneinheitliche Ergebnisse (s. Tab. 1). Nur zweimal kam es zum Schock. Der Allgemeinzustand wurde unterschiedlich beeinflußt, so daß die Tötung innerhalb von 3—8 Tagen vorgenommen werden mußte. Eine Blutzuckersenkung war meist vorhanden. Dagegen nur in der Hälfte der Fälle eine A-Zellschädigung im Sinne einer schweren Degranulation bei nur geringfügiger Vakuolisation. Besonders auffallend war der Befund bei

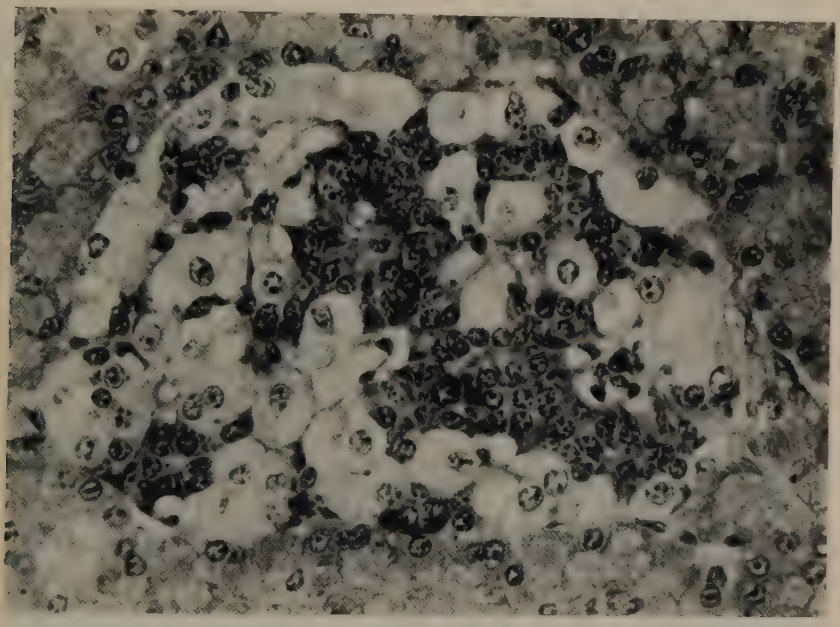


Abb. 1. LANGERHANSsche Insel eines Meerschweinchens, das 3 Tage täglich 3 mg/kg Synthalin A subcutan erhielt und trotz laufender Glucagongaben drei Stunden nach der letzten Injektion im Schock starb. Man erkennt die vollständige Degranulation und hochgradige Vacuolisation der A-Zellen. Die B-Zellen (dunkel) sind gut granuliert. (M 436, Bouin fix, 4 μ, Chromhämatoxylinfärbung nach GOMORI, Obj. Apochr. 25/Optovar 1,6/Ok. 8fach, Leica.)

einem Tier (M 53), das nach der dritten Synthalininjektion einen tödlichen hypoglykämischen Schock bekam, während die A-Zellen völlig intakt waren. Mitosen von A- oder B-Zellen wurden auch bei diesen länger dauernden Versuchen trotz ausgiebiger Suche nur in Ausnahmefällen gesehen. Sie gehören offensichtlich nicht zum Bilde der Synthalinvergiftung. Entsprechend fehlte auch eine Vermehrung der A-Zellen.

In den Sudanpräparaten erwiesen sich die A-Zellenvacuolen als fettfrei. Dagegen fand sich in den meisten Fällen eine leichte bis mäßige kleintropfige Fettablagerung an der Basis der Acinuszellen.

Der nach den Inselveränderungen eindruckvollste Befund war an der *Leber* sämtlicher Tiere zu erheben. Hier fand sich eine mäßige läppchenintermediär betonte, häufig aber auch diffuse fein- bis mitteltropfige Verfettung. Die

läppchenperipher gelegenen Leberzellen zeigten im Sudanpräparat bei nur spärlicher oder fehlender Verfettung eine starke Aufhellung und waren in HE und azangefärbten Präparaten nahezu optisch leer. Glykogen fand sich in diesen Zellen nicht, wie überhaupt nur extrem selten in der Leber der synthalinvergifteten Tiere noch Glykogen mit der Bestschen Carminfärbung nachgewiesen werden konnte. In den meisten Fällen bestanden außerdem läppchenperiphere mehr oder weniger ausgedehnte Leberzellnekrosen mit Plasmahomogenisierungen und Kernpyknosen und offensichtlich im Anschluß an die Zelluntergänge auftretende Wucherungen des RES (Abb. 2).

Die histologische Untersuchung der Nebennierenrinde ergab in der Regel eine der Schwere der Intoxikation parallelgehende Aktivierung. Das sudanophile

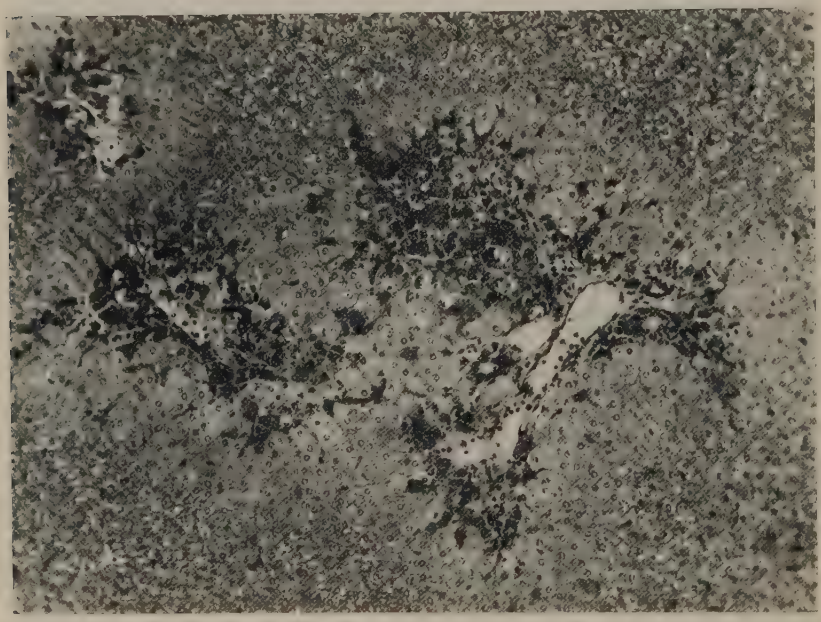


Abb. 2. Leber eines Meerschweinchens, das 2 Tage täglich 3 mg/kg Synthalin A subcutan erhielt und trotz laufender Glucagongaben 12 Std nach der letzten Injektion im Schock starb. Man erkennt die läppchenperiphere Aufhellung mit Nekrosen sowie die Verfettung des übrigen Parenchyms. (M 448, Bouin fix, 6 μ, Azan, Obj. 10/Optovar, 1,0/Ok. 8fach, Leica.)

Material, das bei normalen Meerschweinchen nur die Außenzone der Rinde einnimmt, hatte sich bis zur Markgrenze ausgebreitet. Von der Außenzone beginnend, fand sich zusätzlich eine wechselnd starke Entspeicherung, so daß in Extremfällen eine Umkehr der Rindenstruktur stattgefunden hatte, insofern, als die sudanophile Zone bzw. im Paraffinpräparat die Spongiocytenschicht innen zu finden war, während in der äußeren Rinde das sudanophile Material fehlte (vgl. hierzu Creutzfeldt, Husten u. Haager, 1953). In der äußeren Rindenschicht fanden sich meist zahlreiche Mitosen. Im Nebennierenmark fiel eine wechselnd starke Degranulierung und Vakuolisierung der Zellen auf. Außerdem beobachtete man zwischen den Zellbalken unregelmäßige optisch leere Räume von bizarrer Gestalt. Die Veränderungen am Nebennierenmark waren in ihrer Stärke wechselnd, fehlten jedoch nur in wenigen Fällen vollständig.

b) *Phosphorvergiftung.* Weißer Phosphor wurde in Paraffinöl gelöst subcutan verabreicht. Die Ergebnisse der Versuche sind in Tab. 2 zusammengestellt. Die tägliche Injektion von 10 mg/kg Phosphor führte mit einer Ausnahme nach 2 Tagen zu schweren hypoglykämischen Krämpfen. Nach einmaliger Injektion von 10 mg/kg Phosphor kam es nur zweimal zu spontanen Schocks. Bei den übrigen am dritten Tag getöteten Tieren war fünfmal der Blutzucker normal, einmal deutlich erniedrigt.

Tabelle 2. *Phosphorversuche an Meerschweinchen*

Tier Nr.	Phosphordosis (mg/kg) s. c.	Versuchsdauer in Stunden bis zur Tötung bzw. Tod im Schock*	Blutzucker beim Tode (mg-%)	Schock	A-Zellen		
					Degranulation **	Vakuolisation **	Mitosen ***
M 72	täglich 10	52	48	+	++++	(+)	∅
M 81	„ 10	52×	21	+	+++	(+)	(+)
M 82	„ 10	53	19	+	+++	+(+)	∅
M 83	„ 10	59	23	+	+++	(+)	∅
M 73	„ 10	59×	73	∅	++++	+	∅
M 80	10	11×	16	+	+	∅	∅
M 407	10	24	32	+	+(+)	+	∅
M 427	10	76	21	+	++++	∅	+
M 428	10	83×	103	∅	+++	+	+
M 408	10	98×	96	∅	++++	+	+++
M 409	10	98×	103	∅	++++	(+)	++
M 410	10	98×	98	∅	+++	+	++
M 420	10	98×	39	∅	++++	+	++
M 421	10	98×	86	∅	++++	(+)	++
M 429	10 + 3 Stdl.	48	36	+	+++	∅	∅
M 431	10 + 10 γ Gluca-	66	41	+	++++	+	+
M 432	10 gon i.p.	68	63	(+)	+	+	(+)

* Siehe Tabelle 1.
** Siehe Tabelle 1.
*** + = überhaupt A-Zellmitosen gefunden.
++ = bis 1 A-Zellmitose pro Insel.
+++ = mehr als 1 A-Zellmitose pro Insel.

Histologisch fand sich an den Pankreasinseln als regelmäßiger Befund nach über zweitägiger Phosphorvergiftung eine hochgradige bis vollständige Degranulation der A-Zellen. In Gomori-Azanpräparaten war entweder nur *ein* ungranulierter Zelltyp auszumachen oder die A-Zellen waren sogar deutlich heller als die B-Zellen. In Chromalaun-Präparaten fehlte jegliche Rotfärbung der A-Zellen. Sie waren blaßgrau homogen oder leicht schaumig strukturiert, und meist größer als normal. Die Zellkerne waren groß und häufig sehr chromatinarm. Kernpyknosen wurden nicht gesehen. Die B-Zellen erschienen meist kräftig blau granuliert und wesentlich kleiner als die A-Zellen. Vollständig vakuolisierte A-Zellen sind selten, lassen sich jedoch in fast allen Fällen von Phosphorvergiftung nachweisen (Abb. 3). Häufiger begegnen perinucleäre Aufhellungen und kleine Vakuolen. Bei der Phosphorvergiftung scheinen Vacuolisationen im Gegensatz

zur Kobaltchlorid- und akuten Synthalinvergiftung nur in vollständig degranulierten A-Zellen aufzutreten. Als bemerkenswerter Befund ist das Auftreten von A-Zellmitosen zu erwähnen. Normalerweise trifft man in den Langerhansschen Inseln praktisch keine Mitosen. 3—4 Tage nach einmaliger Phosphorinjektion fanden wir jedoch regelmäßig im Bereich der degranulierten A-Zellhaufen einzelne mitotische Figuren aller Stadien, in einigen Fällen in jeder Insel mehrere (Abb. 4 und Tab. 2). Obwohl Zellen während der Mitose ihre spezifischen Granulationen weitgehend

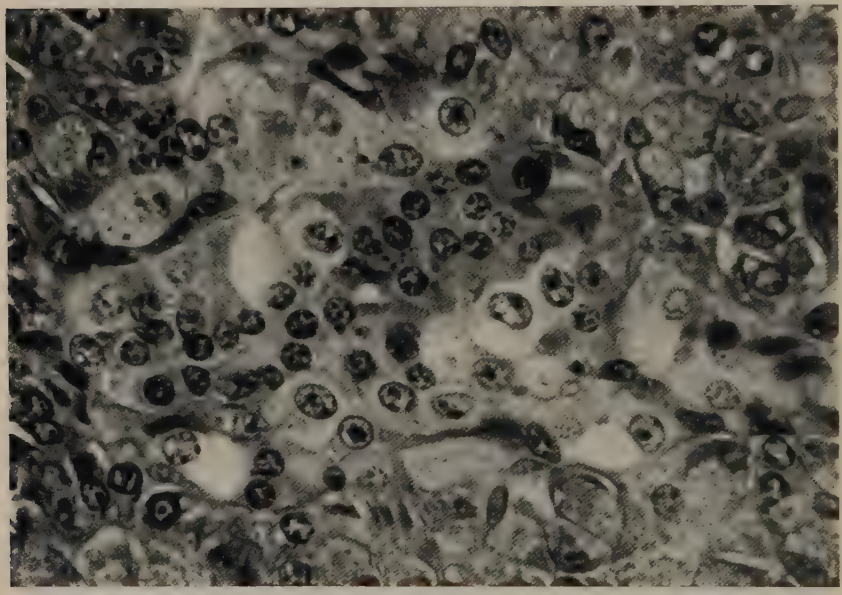


Abb. 3. Langerhanssche Insel eines Meerschweinchens, das täglich 10 mg/kg Phosphor subcutan erhielt und 5 Std nach der dritten Injektion im Schock starb. Man erkennt die vollständige Degranulation und teilweise Vakuolisation der A-Zellen (hell). Einige normalgranulierte B-Zellen erscheinen dunkel (M 82, Technik wie Abb. 1).

verlieren, dürfte an der Zugehörigkeit der von uns gesehenen Teilungsfiguren zum A-Zellsystem kein Zweifel sein. Einmal berechtigt die Lage inmitten von degranulierten A-Zellen zu dieser Zuordnung, und zum anderen konnten wir in den seltenen Fällen von B-Zellteilungen, die wir im Laufe der Zeit zu sehen Gelegenheit hatten, noch spärlich β-Granula im Plasma erkennen. In den besonders mitosereichen Fällen gewinnt man den Eindruck einer A-Zellvermehrung (Abb. 4).

Im exokrinen Gewebe fanden wir außer gelegentlichen fein-mitteltropfigen Fettablagerungen in den Acinuszellen keine Besonderheiten. In der *Leber* ließen sich die für die Phosphorvergiftung bekannten Veränderungen nachweisen: Mäßige bis schwere diffuse Verfettung und zusätzlich wechselnd ausgeprägte Durchsetzung mit nahezu optisch leeren nur spärlich feintropfig verfetteten Leberzellen. In einigen

Fällen war es außerdem zu fleckförmigen Nekrosen gekommen. Regelmäßig war die Leber glykogenfrei in den nach BEST gefärbten Präparaten.

An der Nebennierenrinde fanden sich fast immer die Zeichen einer schweren Aktivierung (Ausbreitung, Entspeicherung und Verlagerung der sudanophilen Substanzen, Rindenmitosen). Im Nebennierenmark war es häufig zur Vakuolisation der Zellen und des gesamten Gefüges gekommen und zwar in deutlicher Abhängigkeit zum Verhalten des Blutzuckers in dem Sinne, daß diese Veränderungen bei normalen Blutzuckerwerten nur angedeutet waren oder fehlten, hingegen bei Blutzuckersenkungen und Schocks erhebliche Ausmaße annahmen.

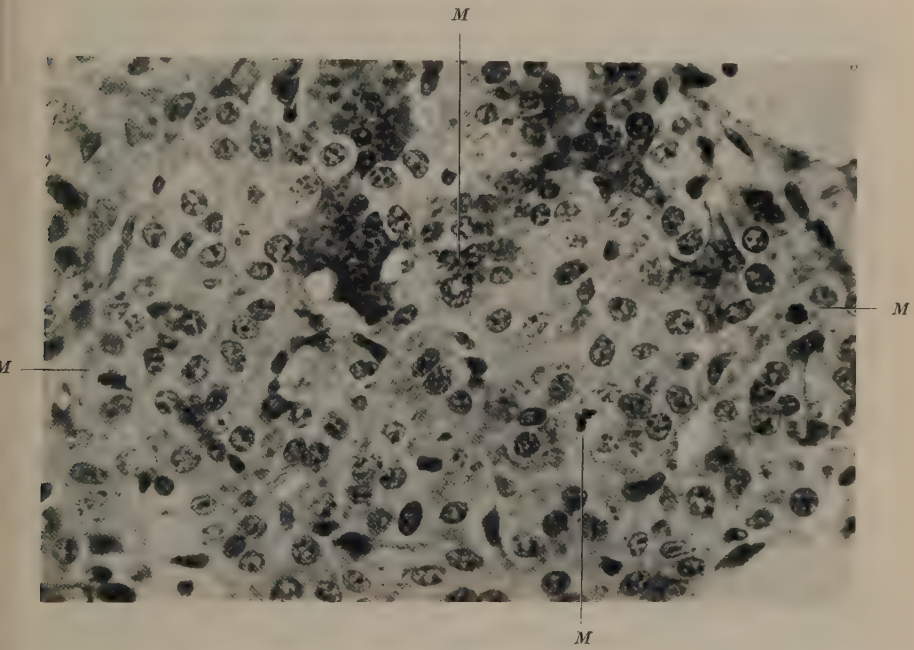


Abb. 4. LANGERHANSsche Insel eines Meerschweinchens, das 10 mg/kg Phosphor subcutan erhielt und 98 Std später getötet wurde. Man erkennt degranulierte A-Zellen, von denen 4 Zellen in Mitose begriffen sind (M). Die wenigen B-Zellen sind dunkel. (M 408, Technik wie Abbildung 1.)

c) *Tetrachlorkohlenstoffvergiftung.* CCl_4 in der Dosis von 0,4 cm^3/kg wurde täglich subcutan gespritzt. Schockerscheinungen traten nicht auf. Die Tiere wurden am 4. bzw. 5. Tag nach Versuchsbeginn in deutlich reduziertem Allgemeinzustand getötet. Die Blutzuckerwerte sind der Tabelle 3 zu entnehmen. Sie lagen in allen Fällen im Bereich der Norm.

Die histologische Untersuchung der Pankreasinseln ergab dreimal normale A-Zellen, zweimal eine mäßige und viermal eine hochgradige Degranulation der A-Zellen (s. Tab. 3). Wie bei den Phosphortieren war in diesen Fällen im GOMORI-Azanpräparat, abgesehen von einzelnen rot granulierten Zellen, nur noch *ein* ungranulierter Zelltyp vorhanden. Im Chromalaun-Präparat waren die A-Zellen blaßblau. Eine A-Zellvakuolisation war nur einmal deutlich vorhanden (Abb. 5), einmal

begegneten vereinzelte vakuolisierte Zellen, fünfmal fehlten solche vollständig. Auch A-Zellmitosen wurden nicht beobachtet. Die B-Zellen waren stets gut granuliert.

Tabelle 3. *Tetrachlorkohlenstoffversuche an Meerschweinchen*

Tier Nr.	Anzahl der CCl_4-Injektionen (0,4 cm³/kg/Tag s. c.)	Versuchsdauer in Stunden bis zur Tötung	Blutzucker beim Tode mg-%	A-Zellen **	
				Degranulation	Vakuolisation
M 65	4	77	79	+++	++
M 66	4	77	86	(+)	∅
M 58	3	80	88	+++	∅
M 411	5	98	106	++	∅
M 412	5	98	93	∅	∅
M 413	5	98	96	+++	(+)
M 414	5	98	103	+++	(+)
M 60	4	99	76	∅	∅
M 61	4	109	82	++	(+)

** Siehe Tab. 1.

In den exokrinen Pankreaszellen fand sich basal meist eine deutliche Verfettung im HS-Präparat und eine Vacuolenbildung im Paraffinschnitt. Das Ausmaß dieser Verfettung stand jedoch in keiner Beziehung zur Schwere der A-Zellenveränderung. Die *Leber* bot regelmäßig das Bild der schweren CCl_4-Schädigung mit diffuser Verfettung, ausgedehnten läppchenzentralen Nekrosen und R.E.S.-Wucherungen, sowie zahlreichen optisch leeren großen Vacuolen besonders in der intermediären Läppchenzone. Durch die Carminfärbung nach Best ließ sich meist nur spärlich Glykogen nachweisen. Häufig waren aber noch einzelne glykogenhaltige Leberzellen in einem schmalen Saum um die läppchenzentrale R.E.S.-Wucherung angeordnet.

An der Nebennierenrinde fand sich in allen Fällen das Bild der hochgradigen Aktivierung (Ausbreitung, Entspeicherung und Verlagerung der sudanophilen Substanzen, Rindenmitosen). Das Nebennierenmark zeigte nur spärlich degranulierte und vakuolisierte Zellen.

d) *Chloroformvergiftung.* $CHCl_3$ wurde täglich subcutan in der Dosis von 0,5 cm³/kg injiziert. 2 Tiere starben in der Nacht, ein Tier mußte am zweiten Tag getötet werden, die anderen wurden am vierten Tag in nur mäßig reduziertem Allgemeinzustand getötet. Die Blutzuckerwerte bei der Tötung waren normal (Tab. 4).

Die histologische Untersuchung der Pankreasinseln ergab zweimal normale Verhältnisse (davon war 1 Tier nur 25 Std im Versuch), einmal eine angedeutete, zweimal eine starke und dreimal eine vollständige Degranulation der A-Zellen. In Gomori-Azanpräparaten waren sie daher von den B-Zellen nicht sicher zu unterscheiden, während sie in den Chromalaunpräparaten bar jeglicher Phloxinanfärbung blaßblau und locker strukturiert gegen die dunkelblau granulierten B-Zellen abstachen. Vakuolisationen waren nur einmal an einzelnen vollständig degranulierten A-Zellen nachzuweisen. Einzelne A-Zellmitosen begegneten in 2 Fällen. 1 Tier hatte in nahezu jeder Insel 1—2 Mitosen.

Am exokrinen Gewebe sah man häufig Fetttropfen in Acinuszellen. Die *Lebern* zeigten regelmäßig schwere Verfettungen des erhaltenen Parenchyms und vereinzelt

zusätzlich große vakuolisierte Zellen. Außerdem war es zu mehr oder weniger ausgedehnten läppchenzentralen Nekrosen mit leichten Wucherungen des R.E.S. gekommen. In den nach BEST gefärbten Präparaten ließ sich nur spärlich Glykogen nachweisen. In der Regel lagen die glykogenhaltigen Zellen in einer läppcheninter-mediärgelegenen Zone. Einige Lebern waren völlig glykogenfrei. Eine Beziehung zwischen A-Zelldegranulation und Glykogengehalt der Leber bestand nicht.

Die Nebennierenrinde der Tiere bot in der Regel das Bild einer hochgradigen Aktivierung mit Ausbreitung der sudanophilen Substanzen bis zum Mark. Die

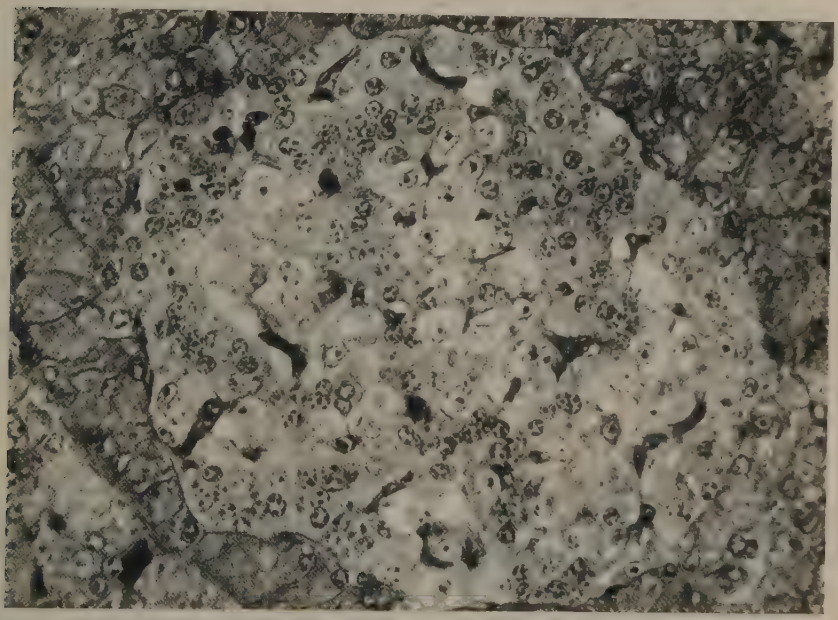


Abb. 5. LANGERHANSsche Insel eines Meerschweinchens, das 4 Tage täglich 0,4 cm³/kg CCl_4 subcutan erhielt und 5 Std nach der letzten Injektion getötet wurde. Man erkennt die vollständige Degranulation und teilweise Vakuolisation der A-Zellen (hell). (M 65, Azanfärbung nach GOMORI, sonst Technik wie Abbildung 1.)

Außenzone war teilweise schon an sudanophilem Material verarmt. Außerdem begegneten zahlreiche Mitosen in der Rinde. Auffällig war, daß die beiden Tiere, die keine A-Zellveränderungen hatten, nur geringfügige Aktivitätszeichen in der Nebennierenrinde aufwiesen. Bereits VERNE u. HÉBERT (1951) betonten, daß A-Zellschäden nach $CHCl_3$ nur bei gleichzeitigen Nebennierenrindenveränderungen zu beobachten seien. Im Nebennierenmark fehlten Vacuolen.

e) *Äthioninvergiftung.* Weibliche Meerschweinchen erhielten täglich d-l-Äthionin in der Dosis von 500 oder 250 mg/kg intraperitoneal. Diese die Leber und andere Organe schädigende Substanz (FARBER, SIMPSON u. TARVER, 1950) wirkt wahrscheinlich durch Interferenz mit der normalen Proteinsynthese (LEVINE u. FOPEANO, 1953). Das Äthionin wurde unter Erwärmen in einer Lösung von 1,5 g $NaHCO_3$ und 3 g NaCl in 100 cm³ Aqua dest. möglichst konzentriert in Lösung gebracht. Die Applikation erfolgte sofort nach Verdünnung mit Aqua dest, im Verhältnis 1:2 und verursachte einen kurzen peritonealen Schock. Die Blutzuckerwerte bei der Tötung waren normal (s. Tab. 5).

Die histologische Untersuchung der Pankreasinseln ergab bis auf eine Ausnahme eine deutliche bis schwerste Degranulation der A-Zellen, so daß diese im Gomori-Azanpräparat nicht mehr auszumachen waren (Abb. 6) und im Chromalaunpräparat eine Phloxinanfärbung vermissen ließen. Zu einer Vakuolisation der A-Zellen kam es nicht, dagegen beobachteten wir in $^2/_3$ der Fälle das Auftreten von Mitosen. Das Bild ähnelte also durchaus dem nach Phosphor- und Chloroformvergiftung. Die B-Zellen waren intakt.

Tabelle 4. *Chloroformversuche an Meerschweinchen*

Tier Nr.	Anzahl der $CHCl_3$ Injektionen (0,5 cm³/kg/Tag) s. c.	Versuchsdauer in Stunden bis zur Tötung	Blutzucker beim Tode mg-%	A-Zellen		
				Degranulation **	Vakuolisation **	Mitosen ***
M 301b	2	25	133	∅	∅	∅
M 303b	2	70	82	++(+)	∅	∅
M 304b	2	70	85	∅	∅	∅
M 305b	2	70	83	++++	+	∅
M 306b	3	70	67	++++	∅	+
M 308b	3	70	98	++++	∅	++
M 309b	3	70	103	+++	∅	(+)
M 310b	3	70	101	+	∅	∅

** Siehe Tab. 1.
*** Siehe Tab. 2.

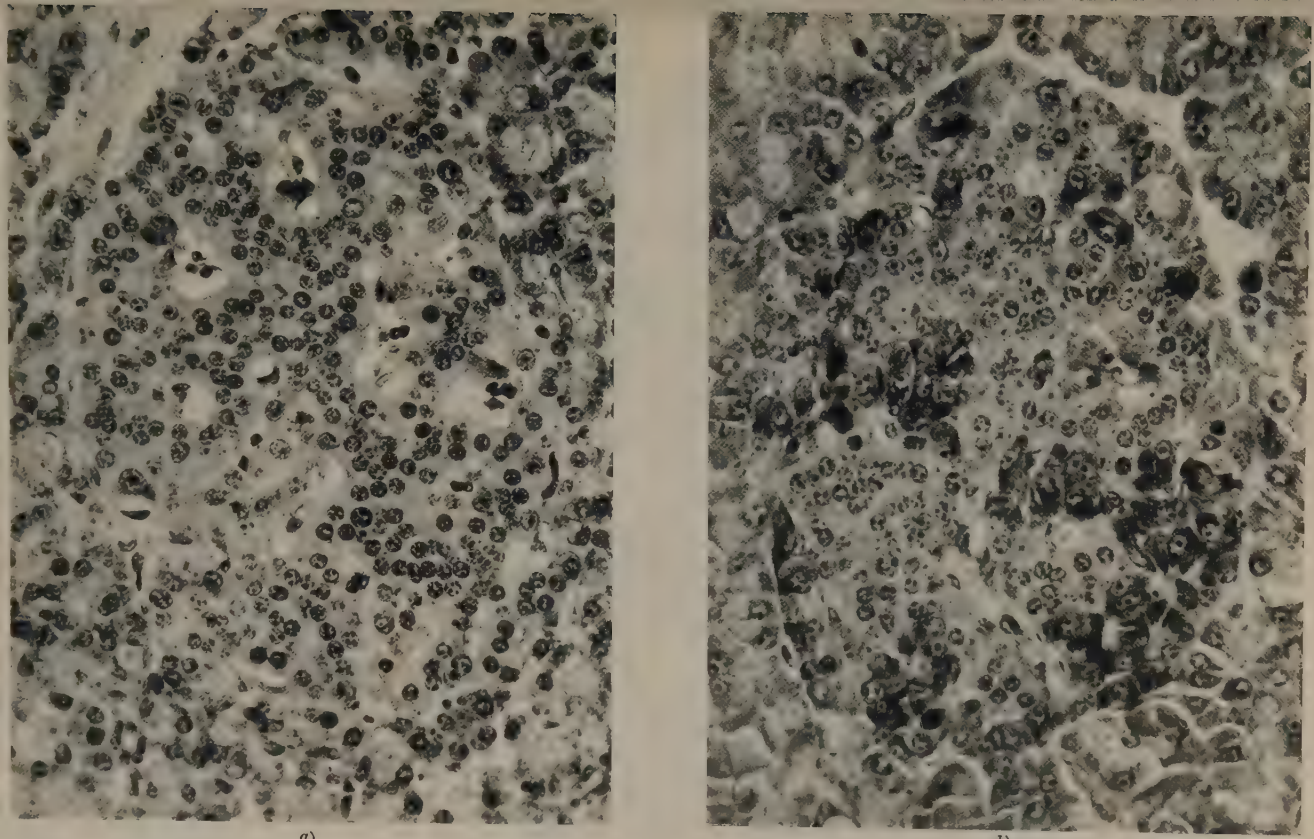
Tabelle 5. *Äthioninversuche an Meerschweinchen*

Tier Nr.	Äthionindosis (mg/kg) i. p.	Versuchsdauer in Stunden bis zur Tötung	Blutzucker beim Tode mg-%	A-Zellen		
				Degranulation **	Vakuolisation **	Mitosen ***
M 413a	1. Tag 500	75	88	+	∅	∅
M 414a	2. Tag 250	75	102	+++	∅	++
M 416a	3. Tag 500	75	75	+++	(+)	∅
M 419a	1. Tag 500	75	103	+++	∅	+++
M 420a	2. Tag 500	75	95	++	∅	+
M 421a	3. Tag 100	75	109	+++	∅	+

** Siehe Tab. 1
*** Siehe Tab. 2.

Zu einer deutlichen Pankreatitis mit Zelldissoziation und Bindegewebsverquellung sowie Nekrosen und Mitosen von Acinuszellen (Farber u. Popper, 1950) kam es nur einmal (M 421a). An der Leber sah man alle Grade von Verfettung von spärlichen läppchenperipheren Fettablagerungen bis zur schwersten diffusen großtropfigen Verfettung. Eine Beziehung zwischen dem Ausmaß der Leberverfettung und der Stärke der A-Zellendegranulation bestand nicht.

An der Nebennierenrinde waren die Zeichen einer deutlichen Aktivierung mit Ausbreitung, Entspeicherung und Verlagerung der sudanophilen Substanzen nachzuweisen. Das Nebennierenmark war nicht verändert.



a) *b*)

Abb. 6. *a*) LANGERHANSsche Insel eines Meerschweinchens, das 3 Tage täglich 250—500 mg/kg Äthionin intraperitoneal erhielt und am 5. Tage getötet wurde. Man erkennt eine vollständige Degranulation der A-Zellen (M 414a, Bouin fix., 4 μ, Azanfärbung nach GOMORI, Obj. Apochr, 25/Optovar 1,0/Ok. 8fach, Leica). *b*) Insel eines Kontrolltieres mit kräftig rot granulierten A-Zellen (dunkel). (M 299, Technik wie *a*), jedoch Optovar 1,6.)

f) *IPTD-Vergiftung.* Das in Wasser unlösliche p-Aminobenzosulfonamidisopropylthiodiazol (IPTD) wurde unter Erwärmung entweder in Propylenglykoll gelöst oder nach Loubatiéres (1946) 20%iger Na_2CO_3-Lösung solange zugesetzt, bis das p_H 7,9 betrug. Kontrollversuche über mehrere Tage ergaben, daß 2 cm^3 Propylenglykoll intraperitoneal und subcutan vom Meerschweinchen gut vertragen wurde. Die orale Applikation des mit Na_2CO_3 gelösten IPTD erfolgte vermittels einer Injektionsspritze mit gebogener stumpfer Kanüle. Die intraperitoneale Injektion des IPTD im Propylenglykoll (6 Tiere 3 –6 mal 0,3 g/kg) führte in allen Fällen zu einem zunehmenden Schwächezustand der Tiere, die schließlich bewegungslos

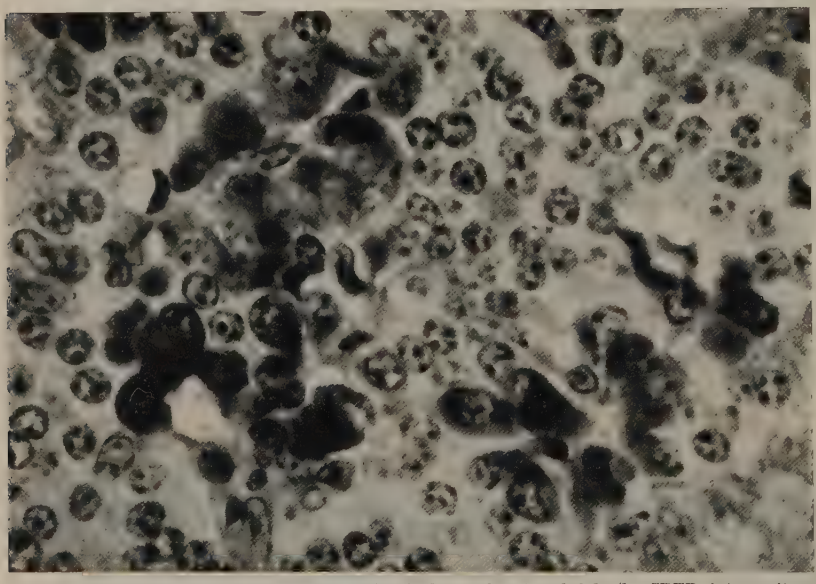


Abb. 7. Langerhanssche Insel eines Meerschweinchens, das 4 mal 0,3 g/kg IPTD intraperitonea erhielt und nach 34 Std getötet wurde. Man erkennt neben normalen A-Zellen (oben) A-Zellen mit homogenisiertem Plasma, die teilweise miteinander verbacken sind (unten). (M 456, Bouin fix, 4 μ Azanfärbung nach Gomori, Obj. Apochr. 25/Optovar 1,6/Ok. 8fach, Leica, Ausschnitt.)

waren und nicht mehr die Kraft zum Fressen hatten. Sie krampften jedoch nicht. 3 Tiere starben nach 34, 54 und 56 Std, die übrigen wurden nach 34 Std getötet. Die Blutzuckerwerte lagen bis auf eine Ausnahme (61 mg-%) im Bereich der Norm. 2 Tiere erhielten 3 Tage lang 0,5 g/kg IPTD in Na_2CO_3-Lösung intraperitoneal. Sie nahmen zwar deutlich an Gewicht ab, zeigten sonst jedoch keine Besonderheiten. Bei oraler Gabe von IPTD in Na_2CO_3-Lösung (2 g/kg, 3 Tiere), war nach 24 Std nichts Auffälliges zu bemerken, die Blutzuckerwerte bei der Tötung lagen etwas niedrig (82, 68 und 61 mg-%). Von 6 Tieren, die täglich 2 g/kg IPTD oral erhielten, starben 3 nach 2 bzw. 3 Tagen über Nacht. Sie wurden ausgeschieden. Die übrigen Tiere wurden am 4. Tag getötet. Der Gewichtsverlust war unterschiedlich, 2 Tiere fielen durch Lähmung der Hinterbeine auf. Krämpfe wurden jedoch nicht beobachtet. Der Blutzucker war nicht deutlich erniedrigt (101, 72 und 75 mg-%).

Die histologische Untersuchung der Organe ergab folgendes: Die A-Zellen der Pankreasinseln waren in keinem Fall vermindert, degranuliert und vakuolisiert. Bei einem Teil von ihnen fiel jedoch eine Ver-

klumpung der α-Granula auf. Die Zellen waren klein, das Plasma nahezu homogen und tiefdunkelrot bei GOMORI-Azanfärbung. Immer wieder erschienen einzelne Zellen miteinander verbacken (Abb. 7). Im Chromalaunpräparat fiel ebenfalls bei einem Teil der A-Zellen eine über die Norm gehende Phloxinfärbung des Plasmas auf. Die Kerne der geschrumpften und in ihrem Plasma homogenisierten Zellen zeigten Deformierungen in Form von Eindellungen der Kernmembran. Echte Kernpyknosen wurden nicht gesehen. Solchen Bildern begegnet man auch bei normalen Meerschweinchen, jedoch selten in der Häufigkeit wie nach IPTD-Behandlung. Am deutlichsten zeigten sich die Plasmahomogenisierungen nach 24 und 34 Std Versuchsdauer, bei längerer Applikation nahmen sie wieder ab. In keinem Falle war aber mehr als $^1/_3$ der A-Zellen verändert. An den B-Zellen fanden sich keine Besonderheiten. Sie waren im Chromalaunpräparat gut blau granuliert.

Das exokrine Pankreasgewebe erschien normal. Die Leber der Versuchstiere war wenig verändert. Nekrosen fehlten vollständig. Leichte bis mäßige Verfettungen fanden sich lediglich in einem Teil der über mehrere Tage gehenden Versuche. Zu einer deutlichen Glykogenentspeicherung kam es viermal bei den mit IPTD in Propylenglykoll vergifteten Tieren und einmal bei IPTD in Na_2CO_3-Lösung. Eine mäßige Nebennierenrinden-Aktivierung (Ausbreitung, Entspeicherung, Rindenmitosen) wurde in 6 Fällen beobachtet. Vakuolisationen des Nebennierenmarks fehlten.

g) *Versuche mit Allylformiat, Penicillin, Hungerstress, Skorbutdiät-Insulin.* Der Vollständigkeit halber seien kurz weitere ergebnislose Bemühungen erwähnt, durch Schädigung der Leber und der Nebenniere sowie durch Blutzuckersenkung die A-Zellen zu alterieren.

5 Meerschweinchen erhielten 3 Tage lang täglich 15 mg Allylformiat subcutan (jeweils vor des Injektion in physiolog. NaCl-Lösung gelöst) und wurden am 4. Tag getötet. Blutzuckersenkungen traten nicht auf. An der Leber zeigten sich wechselnd stark ausgebildete hämorrhagische Nekrosen und eine deutliche bis vollständige Glykogenentspeicherung, eine Verfettung fehlte. Die Nebennierenrinde war mäßig aktiviert. In den Pakreasinseln wurden weder an den A- noch an den B-Zellen Veränderungen beobachtet.

Hohe Dosen Penicillin führen beim Meerschweinchen zu einem schweren Vergiftungsbild mit hochgradiger Aktivierung der Nebennierenrinde (TONUTTI u. MATZNER, 1950). Nach BEIGLBÖCK u. CLOTTEN (1955) spielt hierbei eine Blockierung der SH-Gruppen eine entscheidende Rolle. 5 Meerschweinchen erhielten 80000 E, 3 weitere 160000 E Penicillin/kg i.m. und wurden nach 48 Std getötet. 3 Tiere erhielten 4 Tage lang täglich 80000 E/kg. Die Blutzuckerwerte waren stets normal. Histologisch fanden sich die Zeichen einer schweren Nebennierenrinden-Aktivierung, dagegen völlig normale A- und B-Zellen.

Auch beim Hungerstreß (8 Meerschweinchen 4—6 Tage absoluter Hunger, Wasserzufuhr mit Pipette), der zur schwersten Nebennierenrinden-Aktivierung führt, konnten wir keinerlei Veränderungen an den LANGERHANSschen Inseln beobachten. Die A-Zellen waren gut granuliert.

6 Meerschweinchen erhielten 41—45 Tage lang eine Skorbutdiät nach DEMOLE. Diese führte zu typischen Veränderungen (diffuse, verschieden lokalisierte Blutun-

gen mit starker Beteiligung der Gelenke, Gewichtsabnahme und allgemeiner Schwäche). Die Untersuchung ergab eine mäßige bis hochgradige Nebennierenrinden-Aktivierung (Hoerr, 1931, Tonutti, 1942), sowie eine hochgradige diffuse Leberverfettung, die lediglich bei einem Tier nur schwach ausgebildet war. Die A- und B-Zellen der Pankreasinseln waren völlig normal.

Durch dauernde Applikation hoher Insulindosen versuchten wir möglichst kontinuierlich den Blutzucker von Meerschweinchen zu senken. 5 Tiere erhielten 5 Tage lang täglich 3 mal 2,3 E/kg. Alt-Insulin bzw. 16—32 E/kg Depot-Insulin (Hoechst) subcutan. Die Tiere fraßen abnorm viel, kamen schließlich jedoch in einen hypoglykämischen Schock, der in 2 Fällen durch Glucosezufuhr nicht zu beheben war. Bei der Tötung war in allen Fällen der Blutzucker auf 25—40 mg-% gesenkt. In der Leber fand sich stets reichlich Glykogen, die Nebennierenrinde war nicht sicher aktiviert. Im Nebennierenmark zeigte sich eine mäßige aber deutliche Vacuolenbildung. Die A-Zellen der Pankreasinseln erschienen nicht vermehrt, sie waren ausgezeichnet granuliert und in keinem Fall vakuolisiert. Auch die B-Zellen wiesen eine normale Granulierung auf.

h) *Einfluß von Glucagon auf die $CoCl_2$-, Synthalin- und Phosphorvergiftung.* 8 Meerschweinchen erhielten 3 Tage lang täglich 20 mg $CoCl_2$ subcutan und dreistündlich über die Dauer des gesamten Versuches 10 γ Glucagon intraperitoneal (vor der sechsstündigen Nachtpause 20 γ). Die Tötung erfolgte nach 78 Std, weil ein Teil der Tiere moribund war. Die Blutzuckerwerte waren zu diesem Zeitpunkt völlig normal. An den Pankreasinseln fanden sich eine wechselnd ausgeprägte mäßige bis hochgradige Degranulation und Vakuolisation der A-Zellen. Die B-Zellen waren intakt, die Nebennierenrinde war meist deutlich aktiviert. Im Nebennierenmark fehlte eine Vakuolisierung. Die Leber zeigte eine leichte bis mäßige diffuse Verfettung. Glykogen war histologisch in allen Fällen reichlich nachzuweisen. Verglichen mit $CoCl_2$-vergifteten Tieren, die kein Glucagon erhielten, ergaben sich keine sicheren Unterschiede im Ausmaß der A-Zellschädigung oder in der Überlebenszeit. Als Vergleichsmaterial benutzten wir die von Creutzfeldt u. Schmidt (1954) veröffentlichten $CoCl_2$-Versuche.

9 Meerschweinchen erhielten 3 mg/kg Synthalin subcutan täglich und gleichzeitig in dreistündlichen Abständen bis zum Tode im hypoglykämischen Schock 10 γ Glucagon intraperitoneal. Vor der sechsstündigen Nachtpause wurden 20 γ Glucagon gespritzt. Die Überlebenszeit, der Blutzuckerwert beim Tode und das Ausmaß der A-Zellschädigung sind aus Tab. 1 ersichtlich. Sämtliche Tiere starben im hypoglykämischen Schock. Der Tod trat im Durchschnitt jedoch etwas früher ein als bei den mit Synthalin allein behandelten Tieren. Bei diesen betrug bei der täglichen Dosis von 3 mg/kg die durchschnittl. Überlebenszeit 52,4 Std (8 Tiere der Tab. 1 und 1 Tier, das nach 36 Std starb, aber ausgeschieden wurde, weil die Sektion nicht sofort vorgenommen werden konnte). Mit gleicher Synthalindosis und zusätzlichen Glucagongaben behandelte Meerschweinchen hatten eine durchschnittliche Überlebenszeit von nur

37,4 Std (9 Tiere der Tab. 1). Die histologische Untersuchung des Pankreas, der Leber und der Nebenniere ergab keinerlei Unterschiede, sofern man die Versuchsdauer beim Vergleich in Rechnung setzt (Abb. 1 und 2).

4 Meerschweinchen erhielten einmalig 10 mg/kg Phosphor i.m. und dreistündlich 10 γ Glucagon intraperitoneal. Ein Tier verblutete nach etwa 58 Std in die Bauchhöhle. Die Befunde der restlichen Tiere sind in Tab. 2 verzeichnet. Sichere Unterschiede zu den mit der gleichen Phosphordosis allein behandelten Tiere waren bei der histologischen Untersuchung der Organe nicht zu verzeichnen.

2. Kaninchenversuche

a) *Synthalinvergiftung bei normalen und alloxandiabetischen Kaninchen.* Kaninchen erhielten 6—9 mg/kg Synthalin A subcutan. In 7 von 9 Fällen kam es zu Blutzuckersenkungen. In 5 Fällen traten hypoglykämische Schocks auf, die sich vorübergehend durch intravenöse Glucosegaben beherrschen ließen. Die Empfindlichkeit der Tiere gegen Synthalin ist also unterschiedlich. Die histologische Untersuchung ergab an den A-Zellen der Langerhansschen Inseln Veränderungen, die in ihrem Ausmaß von Tier zu Tier stark wechselten und nicht mit der Schwere der Hypoglykämie parallel gingen (vgl. Tab. 6). Die Art der Veränderung war jedoch stets gleich. Gleichzeitig mit einer mäßigen, aber selten vollständigen Degranulation treten im Plasma der A-Zellen Vacuolen auf, die im weiteren Verlauf konfluieren und schließlich die ganze Zelle ausfüllen. Anfangs sieht man noch α-Granula am Zellrand angehäuft (Abb. 8), im Endstadium liegt der wohl erhaltene, jedoch chromatinarme Kern in einer optisch leeren Blase, wobei meist noch einige Plasmafäden zum Zellrande ziehen. Zur Entwicklung der A-Zellvakuolisation ist eine gewisse Zeit notwendig. Davis (1952) sah die hydropische Degeneration der A-Zellen frühestens nach 13 Std. Auch wir konnten nach $13^1/_2$ Std nur spärliche A-Zellveränderungen finden. In späteren Stadien waren nur einmal sämtliche A-Zellen vakuolisiert (K 30, Abb. 9). Bei diesem Tier war die ballonartige Auftreibung der vakuolisierten Zellen so ausgeprägt, daß sie in ihrer Gesamtheit etwa die Hälfte des Inselraumes einnahmen, wodurch eine A-Zellvermehrung vorgetäuscht wurde. Die Auszählung ergab jedoch eine normale A-B-Zellrelation. In den übrigen Fällen kann von einer Ausschaltung des A-Zellsystems nicht die Rede sein (vgl. Tab. 6). Bei keinem Tier waren die A-Zellen vermindert (bei 5 gesunden Kaninchen fanden wir 14, 15, 19, 19 und 23% A-Zellen bei Auszählung von je 3000 Inselzellen). Die Größe der nichtvakuolisierten A-Zellen wechselte wie bei den Normaltieren stark. Hierbei spielen unterschiedliche Fixierungseinflüsse offensichtlich eine wesentliche Rolle. A-Zellmitosen fehlten.

Tabelle 6. *Synthalinversuche an normalen und alloxandiabetischen Kaninchen*

Tier Nr.	Alloxandiabetes seit	Synthalin mg/kg s. c.	Blutzucker mg-% nüchtern	2	4	6	8	10 Std	Versuchsdauer in Std	Schock	Inselzellen (%) B-Zellen	Normale A-Zellen	Vakuolisierte A-Zellen
K 23	—	1. Tag: 6	130	166	101	↓	↓ ↓	↓ †	10	+	degranuliert		
K 39	—	1. Tag: 6	105					33†	13½	+	77	20	3
K 34	—	1. Tag: 6	102					72	19	∅	76	14	10
		2. Tag: —	57† (nach Adrenalin 0,2 mg s. c.)										
K 33	—	1. Tag: 9	108					84	23	∅	73	15	12
		2. Tag: —	63×										
K 22	—	1. Tag: 6	114	140	102	98	96	102	30	+	80	12	8
		2. Tag: —	52↓	102↓	60↓	53↓↓†							
K 38	—	1. Tag: 6	115						32	+	66	31	3
		2. Tag: 9		↓		↓	36†						
K 30	—	1. Tag: 6	122	110	126	109	93	96	34	+	75	0	25
		2. Tag: 9	83	46↓	86	68↓	46↓†						
K 31	—	1. Tag: 6	120	116	119	106	96						
		2. Tag: —	98		95		102	96×	36	∅	72	19	9
K 32	—	1. Tag: 6	110										
		2. Tag: —	115						74	∅	81	16	3
		3. Tag: —	141				120×						

Tabelle 6 (Fortsetzung)

K 35	6 Tagen	1. Tag: 6	200	216	63↓	102	88	59×	10	+	51	42	7
K 28	4 Tagen	1. Tag: 6	212	354	254	132	86	†	12	+	autolytisch		
K 27	5 Tagen	1. Tag: 6	326	331	301		256		30	+	39	45	16
		2. Tag: 6	212	176	104	64	64†						
K 36	6 Tagen	1. Tag: 6	216	230	200	186	104		32	+	42	46	12
		2. Tag: 9	112	101↓	83		49†						
K 37	6 Tagen	1. Tag: 6	263	250	209		210	190	33	+	46	35	19
		2. Tag: 9	156	162	126	†	43†						
K 26	5 Tagen	1. Tag: 6	408	396		359	323						
		2. Tag: 6	702	776	745	690	621		51	∅	36	55	9
		3. Tag: —	340	334	236	229×							
K 20	7 Tagen	1. Tag: 6	408	364	318	308	300	306					
		2. Tag: 6	510	528	420	390	358	350	59	∅	23	77	0
		3. Tag: 6	430	420	344	320	256×						

↓ = Schock; i.v. Glucosegabe † = gestorben × = getötet.

Häufig war auch ein Teil der B-Zellen nur schwach granuliert. Vollständige Degranulierungen waren jedoch selten. Vakuolisationen und Zellvergrößerungen fehlten. Im Chromalaunpräparat war in einem Teil der B-Zellen häufig nur am Zellrand ein kräftiger Saum blauer β-Granula. Schon normalerweise ist beim Kaninchen im Gegensatz zum Meerschweinchen der Granulagehalt der B-Zellen etwas unregelmäßig, selten jedoch in dem Ausmaß wie beim synthalinvergifteten Tier. Möglicherweise sind die B-Zelldegranulierungen Folge der Glucosegaben.

Die *Leber* weist nach Synthalin regelmäßig charakteristische Veränderungen auf. Schon 10 Std nach der Injektion ist in Paraffinschnitten die Läppchenperipherie stark aufgehellt. Das Plasma erscheint optisch leer. Die Kerne sind sehr chromatinarm, später sieht man in diesem Gebiet Leberzellennekrosen mit acidophilem Plasma und Kernpyknosen, bisweilen auch R.E.S.-Wucherungen und Gewebsdissoziationen. Im Sudanpräparat ist die läppchenperiphere Auf-

hellungszone nur spärlich mit sudanophilen Tröpfchen bestäubt, während sich intermediär und bisweilen auch läppchenzentral eine mäßige bis hochgradige Leberzellverfettung findet. Bei der Carminfärbung erwiesen sich die Lebern der Versuchstiere bis auf einen Fall (K 32) als völlig glykogenfrei.

An der Nebennierenrinde war bisweilen kein pathologischer Befund zu erheben, in vielen Fällen war jedoch eine mäßige bis hochgradige Verarmung an sudanophilen Substanzen zu beobachten. Dieser Unterschied zum Meerschweinchen beruht auf der Tatsache, daß die vermehrte Nebennierenrindentätigkeit beim Kaninchen

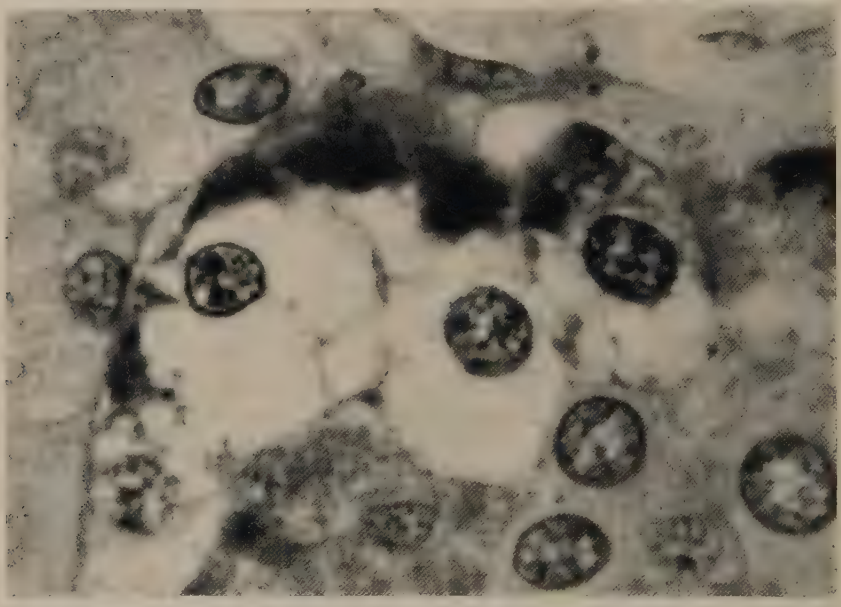


Abb. 8. Ausschnitt aus einer Langerhansschen Insel eines Kaninchens, das 6 mg/kg Synthalin A subcutan erhielt, jedoch mit keiner Blutzuckersenkung reagierte und 36 Std später getötet wurde. Man erkennt eine Gruppe vacuolisierter A-Zellen mit Granularesten am Zellrand. (K 31, Bouin fix, 4 μ, Azanfärbung nach Gomori, Obj. Apochr. H. I. 100/Optovar 1,6/Ok. 8fach, Leica.)

morphologisch schwer zu erfassen ist. Sehr ausgeprägt und regelmäßig ließen sich Veränderungen am Nebennierenmark nachweisen. Sie fehlten lediglich bei K 32, wo ja auch eine Blutzuckersenkung und Glykogenentspeicherung der Leber ausblieb. Die Markveränderungen bestehen in einer mäßigen bis hochgradigen Vakuolisation der Zellen, wobei vom Zellrand zum Kern schmale Plasmafäden ziehen. Die Kerne sind meist intakt, nicht selten findet man jedoch Kernpyknosen (Abb. 10).

7 alloxandiabetische Kaninchen, deren Hyperglykämie seit 4—7 Tagen bestand, erhielten 6—9 mg/kg Synthalin subcutan. Nur in 2 Fällen blieb eine sichere Wirkung auf den Blutzucker aus. (vgl. Tab. 6). Diese beiden Tiere hatten vor der Synthalingabe ständig Blutzuckerwerte über 400 mg-%. Nach 2 bzw. 3 Injektionen war die Hyperglykämie etwas zurückgegangen, was jedoch damit erklärt werden kann, daß die Tiere

infolge der zunehmenden Intoxikation und Leberschädigung nichts mehr fraßen. 5 Tiere, die Nüchternblutzuckerwerte zwischen 200 und 300 mg-% aufwiesen, reagierten mit deutlichen Blutzuckersenkungen und hypoglykämischen Schocks. Ein Tier schockte bereits 4 Std nach der Injektion von 6 mg/kg. Synthalin, ein Tier nach 10 Std, während die übrigen erst nach der zweiten Synthalingabe hypoglykämisch wurden.

An den Pankreasinseln fand sich die bekannte Verschiebung der A-B-Zellenrelation durch die alloxanbedingte B-Zellenzerstörung. Die rest-

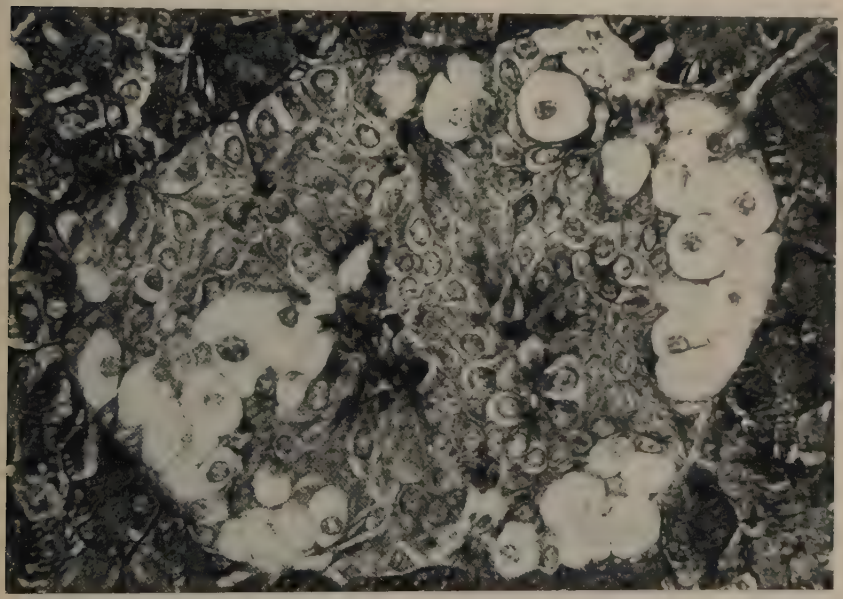


Abb. 9. LANGERHANSsche Insel eines Kaninchens, das am 1. Tag 6, am 2. Tag 9 mg/kg Synthalin A subcutan erhielt und 8 Std nach der zweiten Injektion im Schock starb. Man erkennt eine vollständige Vakuolisation sämtlicher A-Zellen und eine unregelmäßige Granulierung der B-Zellen. (K 30, Technik wie Abb. 1.)

lichen B-Zellen waren außerdem sehr granulaarm und bisweilen vakuolisiert als Zeichen ihrer abnormen Belastung. An den A-Zellen fanden sich wiederum in sehr wechselndem Ausmaß Vakuolisationen und Auftreibungen eines Teiles der A-Zellen, jedoch in keiner Parallelität zu den hypoglykämischen Reaktionen (vgl. Tab. 6). Von einer Ausschaltung der A-Zellen kann morphologisch auch bei dieser Versuchsgruppe nicht gesprochen werden. Anhalt für eine Verminderung der schon normalerweise von Ort zu Ort in ihrer Häufigkeit stark wechselnden Inseln bzw. A-Zellhaufen bestand nicht. Bei den beiden Tieren, die nicht mit einer sicheren Blutzuckersenkung reagiert hatten, waren einmal zahlreiche A-Zellen vakuolisiert und einmal überhaupt keine A-Zellen geschädigt.

An der Leber waren ähnliche Veränderungen zu beobachten wie bei den nichtdiabetischen Tieren, wenn auch ihr Ausmaß etwas geringer zu sein schien. Die Nebennierenrinden waren wiederum unterschiedlich an sudanophilen Substanzen verarmt. Im Nebennierenmark war bei den 5 Fällen mit hypoglykämischen Reaktionen eine deutliche bis hochgradige Vakuolisation zu verzeichnen. Diese Veränderungen fehlten bei den beiden Tieren, die auf Synthalin keinen Blutzuckerabfall gezeigt hatten (K 26 und K 20).

b) *Wirkung von Glucagon auf die Synthalinvergiftung des Kaninchen.* Während bei normalen nüchternen Kaninchen durch eine einmalige intra-

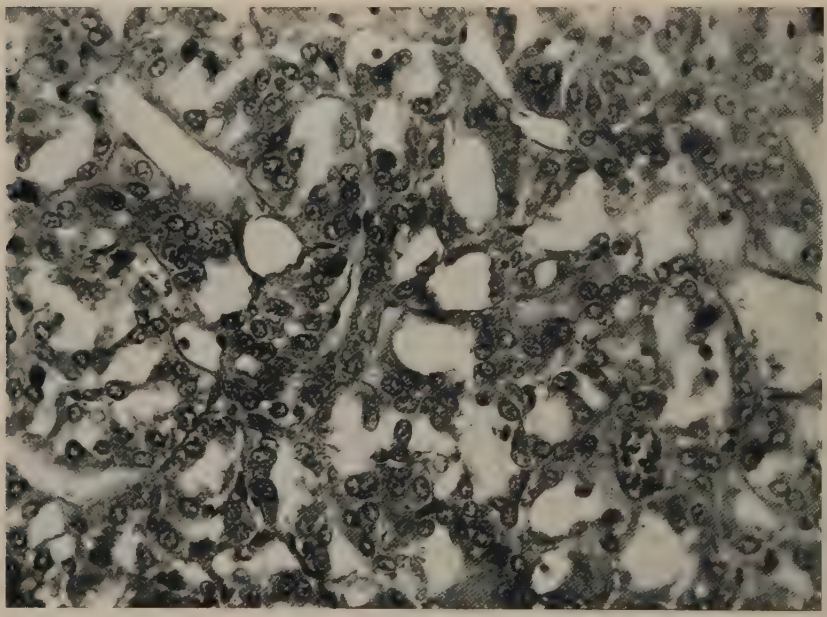


Abb. 10. Nebennierenmark des gleichen Kaninchen wie Abb. 9. Man erkennt eine deutliche Vakuolisierung der Markzellen. (K 30, Bouin fix, 6 μ, Azan, Obj. Apochr. 25/Optovar 1,0/Ok. 8fach, Leica.)

venöse Injektion des von uns benutzten Glucagonpräparates ein Blutzuckeranstieg auf durchschnittlich 200 mg-% nach 15 min regelmäßig zu erzeugen war, reagierten synthalinvergiftete Kaninchen selbst auf 30 γ/kg Glucagon i.v. überhaupt nicht mit einer Blutzuckersteigerung (vgl. Creutzfeldt und Tecklenborg, 1955, Abb. 1). Die blutzuckersenkende Wirkung des Synthalin läßt sich durch dauernde Glucagongaben nicht kompensieren. 4 Kaninchen erhielten gleichzeitig mit der subcutanen Injektion von 6 mg/kg Synthalin 30 γ/kg. Glucagon intraperitoneal und bis zum Tode im Schock stündlich die gleiche Glucagondosis. Kontrollversuche an gesunden Kaninchen ergaben, daß die intraperitoneale Glucagongabe voll wirksam ist und in ihrer Wirkung länger anhält als die intravenöse. Gewichtsmäßig sind 30 γ Glucagon etwa

⅓ E Insulin äquivalent, wenn man 22 E/mg kristallinen Insulins rechnet und bedenkt, daß die Reinheit unseres Glucagonpräparates gemessen am kristallinen Glucagon 50% beträgt. Wie aus Tab. 7 ersichtlich ist, traten bei sämtlichen Tieren bereits nach 4—6 Std hypoglykämische Schocks auf, die sich trotz dauernder intravenöser Glucosegaben in rascher Folge wiederholten. Verglichen mit den oben referierten Synthalinversuchen (s. Tab. 6) beschleunigt das Glucagon offensichtlich das Auftreten der Schocksymptome. Die A-Zellveränderungen waren nur gering. Ein sicherer Unterschied zu den einfachen Synthalinversuchen läßt sich bei der geringen Zahl der Versuche allerdings nicht behaupten. Ebensowenig kann man die anscheinend etwas leichteren Leberveränderungen als Folge der Glucagonbehandlung werten. Glykogen war in den Carminpräparaten nicht nachzuweisen. Das Nebennierenmark zeigte bei den 4 Tieren eine schwere Vakuolisation der Zellen.

c) *Wirkung von IPTD an normalen und tetrachlorkohlenstoffvergifteten Kaninchen.* 7 normale Kaninchen erhielten in H_2O aufgeschwemmtes oder in 20%iger Na_2CO_3-Lösung gelöstes IPTD (p_H 7,9) in der Dosis von 1—2 g/kg. Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 8 zusammengestellt. Man erkennt nahezu regelmäßig eine Blutzuckersenkung nach 4—6 Std auf durchschnittlich 50 mg-%. Am nächsten Morgen waren die Nüchternblutzuckerwerte in allen Fällen wieder normal. Bei erneuter IPTD-Gabe erfolgte wiederum eine Blutzuckersenkung. Die Dosis von 1 g/kg führte zu keinen besonderen klinischen Erscheinungen. Die Tiere wurden in gutem Zustand getötet. Bei der Dosis von 2 g/kg traten bei 2 Tieren (K 104 und K 107) je zweimal Krämpfe auf. Nur einmal war dabei der Blutzucker auf hypoglykämischen Werten. Auf intravenöse Glucosegabe

Tabelle 7. *Verlauf der Synthalinvergiftung bei stündlichen intraperitonealen Gaben von 30 γ/kg Glucagon beim Kaninchen*

Tier Nr.		Blutzucker mg-%												Überlebenszeit	Inselzellen %		
		Stunden														Normale	Vakuolisierte
	nüchtern	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	in Std	B-Zellen	A-Zellen	A-Zellen
K 40	107	88↓		→	↓↓	↓↓↓	56†						17½	80	15	5
K 41	96	93↓	75	↓	↓↓↓	↓↓↓	46†						18	81	12	7
K 42	119	109↓		90	↓↓	↓↓	↓↓↓	83†					20	73	22	5
K 43	110			↓	87↓	↓↓		↓83			59↓↓	43†	32	79	16	5

6 mg/kg Synthalin s.c. — 9 mg/kg Synthalin s.c.

→ = i.v. Gabe von 10—20 cm³ 10% Glucose wegen Schocksymptomen. † = Tod im Schock.

Tabelle 8. *Versuche mit JPTD an Kaninchen*

Tier Nr.	CCl_4 cm^3/kg oral	IPTD g/kg oral	Blutzucker mg-% nüchtern	2 Std	4 Std	6 Std	8 Std	10 Std	Versuchsdauer in Std	Schock	Inselzellen % B	A
K 44	—	1. Tag: 1*	96	75	70	52	59		24	∅	78	22
		2. Tag: —	76××									
K 45	—	1. Tag: 1*	116	83	61	56	67		24	∅	73	27
		2. Tag: —	83××									
K 49		1. Tag: 1*	126	73	68	63	61					
	—	2. Tag: 1*	98	69	56	63	81		72	∅	78	22
		3. Tag: 1*	96	87	83	86	89					
		4. Tag: —	106××									
K 50		1. Tag: 1*	106	73	41	51	67					
	—	2. Tag: 1*	103	76	63	80	76		72	∅	69	31
		3. Tag: 1*	102	88	81	83	89					
		4. Tag: —	93××									
K 104	—	1. Tag: 2**	107	72	59	86 ↓	106	56	36	+	79	21
		2. Tag: 2**	117	89	110 ↓	190	113	×				
K 109	—	1. Tag: 1,5**	112	87	81	120	145					
		2. Tag: 1,5**	97	93	75	68	70		48	∅	77	23
		3. Tag: —	100××									
K 107	—	1. Tag: 1**	106	81	88	124	136					
		4. Tag: 1**	103	74	66	87	78		8 Tage	+	91	9
		8. Tag: 2**	98	96↓	45	29	33↓	45×				
K 101	0,5	—						†	(42)	∅	92	8
K 110	2×0,3	—						×	(50)	∅	75	25
K 103	0,5	17 Std später 2**	96	45†					1	+	81	19

Tabelle 8 (Fortsetzung)

K 106	0,5	21 Std später 1**	74	57	45↓	940×			5	+	94	6
K 105	0,5	17 Std später 2**	81	61	34↓	84	↓	100×	10	+	85	15
K 102	0,5	60 Std später 1. Tag: 1**	93	70	68	57		65	36	∅	90	10
		2. Tag: 2**	94	66	37	37		29×				
K 108	0,5	24 Std später 1**	85	102	104	80		78	5 Tage	∅	95	5
	4 Tage später 0,5	24 Std später 1**	120	98		81		92×				

* In H_2O aufgeschwemmt.
** In 20%iger Na_2CO_3-Lösung (p_H 7,9).
↓ = Krämpfe; i.v. Glucosegabe.
† = Gestorben
× = In moribundem Zustand getötet.
×× = In gutem Zustand getötet.

verschwanden die Krämpfe, ein zunehmender Schwächezustand war jedoch nicht aufzuhalten. Schließlich waren die Hinterbeine gelähmt. Bei der Sektion fand sich als Zeichen einer gleichzeitig bestehenden Blasenlähmung etwa 100 cm³ Urin in der enorm dilatierten Harnblase.

Die histologische Untersuchung der Pankreasinseln deckte meist keine pathologischen Veränderungen an den A-Zellen auf (Abb. 11). In einigen Fällen fanden sich jedoch ähnliche Veränderungen wie beim Meerschweinchen. Wechselnd viele A-Zellen zeigten Verklumpungen ihrer spezifischen Granulationen. Diese Zellen waren meist deutlich kleiner als normalerweise und imponierten in einzelnen Fällen nur noch als kleine stiftchenförmige Elemente. Auch die Zellkerne waren deutlich kleiner als normal. Pyknosen sahen wir jedoch nicht. Eine Verminderung der A-Zellzahl war nur in einem Fall nachzuweisen. Degranulationen und Vakuolisationen fehlten völlig. Die B-Zellen zeigten meist eine normale Granulierung. In der Leber fanden sich bis auf eine leichte diffuse Verfettung in 4 Fällen keine Besonderheiten. Nur einmal war in den Carminpräparaten das Glykogen vermindert, in den übrigen Fällen im Bereich der Norm. An den Nebennierenrinden hatte man den Eindruck einer Entspeicherung des sudanophilen Materials. Eine Vakuolisation des Nebennierenmarks wurde nur einmal

(K 107) beobachtet, hier jedoch sehr ausgeprägt. Bemerkenswerterweise war dieses Tier das einzige, das unter IPTD eine schwere Hypoglykämie entwickelt hatte.

Erwähnenswert ist noch das Verhalten eines Kaninchens, das 150 mg/kg IPTD in Propylenglykoll intraperitoneal erhielt. Während bei 2 anderen Kaninchen die gleiche Dosis zu einer leichten Blutzuckersenkung auf 81 und 75 mg-% führte, erfolgte bei diesem Tier ein kontinuierlicher Blutzuckeranstieg bis auf 280 mg-% nach 8 Std. Am nächsten Morgen war der Blutzucker wieder normal. Die Sektion ergab eine schwerste Coccidiose der Leber, die Pankreasinseln waren normal.

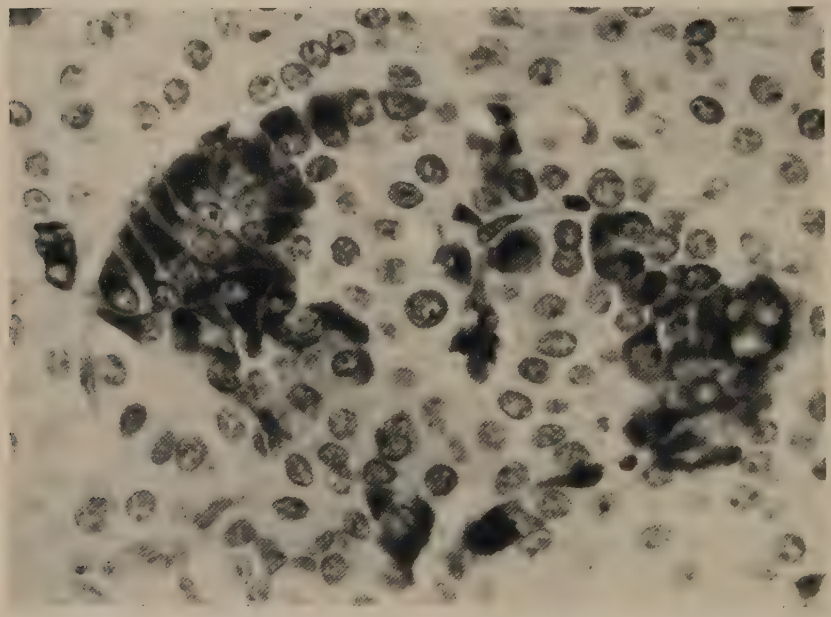


Abb. 11. Langerhanssche Insel eines Kaninchens, das dreimal auf 1 g/kg IPTD mit einer deutlichen Blutzuckersenkung reagierte und am vierten Tag getötet wurde. Man erkennt eine A-zellreiche Insel mit wohl erhaltenen A-Zellen. (K 50, Technik wie Abb. 5.)

Ausgehend von dieser Beobachtung prüften wir die Wirkung des IPTD an 5 Kaninchen, denen wir zum Zwecke der Leberschädigung am Vortage 0,5 cm^3/kg CCl_4 oral mit der Schlundsonde verabfolgt hatten. Eine Blutzuckersteigerung trat nicht ein, vielmehr gerieten einige Tiere erheblich rascher (K 103 nach einer, K 106 nach 4, K 105 nach 6 Std) in einen hypoglykämischen Zustand mit Krämpfen. Traubenzuckerzufuhr vermochte bei 2 Tieren zwar den Blutzucker zu steigern, nicht aber das schwere Intoxikationsbild zu beeinflussen. Sämtliche Tiere hatten bei der Tötung eine Lähmung der hinteren Extremitäten und der Blase.

Bei der histologischen Untersuchung der Pankreasinseln ließen sich wiederum keine Degranulationen und Vakuolisationen der A-Zellen

BOSTON
APR 26 1956

nachweisen. Dagegen fand sich noch wesentlich häufiger als bei reiner IPTD-Vergiftung eine Schrumpfung der A-Zellen mit gleichzeitiger Verkleinerung des Zellkerns. Bisweilen sah man auch pyknotische Kerne in derartig veränderten Zellen. Die Auszählung ergab in einigen Fällen eine Verminderung der A-Zellenzahl. Wieweit bei diesem A-Zellschwund die vorhergehende CCl_4-Vergiftung mit im Spiele war, ist schwer zu entscheiden. Bei alleiniger CCl_4-Vergiftung fanden wir einmal 8% und einmal 25% A-Zellen.

BOSTON MEDICAL
MAY 12 1961
LIBRARY

Die Lebern der Versuchstiere boten das typische Bild der CCl_4-Vergiftung mit läppchenzentralen Nekrosen, vakuolisierten Zellen und Leberzellwucherungen. Um die Nekrosezone herum bestand eine schwere Verfettung der Leberzellen, die bisweilen bis zum Läppchenzentrum reichte. Glykogen war nur spärlich vorhanden. In der Nebennierenrinde war die Entspeicherung an sudanophilem Material sehr ausgeprägt. Das Nebennierenmark zeigte mit Ausnahme von K 108 (keine Hypoglykämie) wechselnd schwere Bilder der Vakuolisation.

3. Rattenversuche

a) *Synthalinwirkung bei normalen und alloxandiabetischen Ratten.* Ratten tolerieren Synthalin A besser als Meerschweinchen und Kaninchen. 2 Tiere erhielten 12 mg/kg subcutan an zwei aufeinanderfolgenden Tagen, 3 Tiere 6 mg/kg subcutan an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Lediglich 1 Tier starb am dritten Tag, jedoch ohne zu schocken. Die übrigen Tiere wurden getötet. Nach jeder Synthalininjektion kam es im Verlauf von 4—6 Std zu deutlichen Blutzuckersenkungen auf durchschnittlich 50 mg-%. Am nächsten Morgen waren die Blutzuckerwerte in der Hälfte der Fälle wieder normal, bei den übrigen Malen um 70 mg-%.

Die histologische Untersuchung der Langerhansschen Inseln ergab normale B-Zellen. Die A-Zellen waren nicht vermindert, ihre Kerne sämtlich intakt. Das Plasma war infolge einer wechselnd stark ausgeprägten Degranulation aufgehellt. Insbesonder perinucleär war es zu einem mäßigen bis vollständigen Granulaverlust gekommen, so daß diese Zone bisweilen optisch leer und vakuolisiert erschien. Eine Auftreibung derart vakuolisierter A-Zellen wie beim Meerschweinchen und Kaninchen war jedoch nicht zu beobachten. Die beschriebenen A-Zellenveränderungen fanden sich zweimal angedeutet, zweimal deutlich und einmal sehr ausgeprägt.

Die Nebennierenrinden sämtlicher Tiere zeigten eine mäßige bis hochgradige Entspeicherung an sudanophilen Substanzen. In der Leber fehlten Nekrosen, nur in 3 Fällen bestand eine leichte unregelmäßige Verfettung. Das Leberglykogen in den Carminpräparaten war einmal normal, zweimal vermindert und fehlte zweimal ganz.

Bei 5 alloxandiabetischen Ratten (Dauer der Hyperglykämie 2—4 Tage) wurden 6 mg/kg Synthalin subcutan zwei- bis viermal gegeben. Zu einer deutlichen Blutzuckersenkung kam es nur bei 2 Tieren. Insbesondere bei hohen Blutzuckerausgangswerten fehlte bei der genannten Synthalindosis ein sicherer Effekt. Der Allgemeinzustand der Tiere verschlechterte sich deutlich. Histologisch fand sich keine sichere Verminderung der schon normalerweise in ihrer Häufigkeit von Ort zu Ort stark wechselnden

A-Zellhaufen. Eine Degranulation der A-Zellen in der oben beschriebenen Form begegnete dreimal. Bemerkenswerterweise fehlte sie bei dem Tier vollständig, das am deutlichsten mit einer Blutzuckersenkung reagiert hatte.

Die Nebennierenrinden zeigten stets eine deutliche Entspeicherung an sudanonphilem Material. Die Lebern waren mäßig bis hochgradig diffus verfettet. Nekrosen fehlten wiederum. Glykogen wurde mit der Carminfärbung nicht mehr nachgewiesen.

b) *Prüfung einer lipotropen Wirkung des Glucagon.* Nach Hartmann u. Mitarb. (1952) kann man die lipotrope Wirkung einer Substanz folgendermaßen prüfen: Ratten erhalten 5 Tage lang 0,5 cm³ CCl_4 pro 100 g subcutan. In dieser Zeit bildet sich in der Leber ein Neutralfettdepot aus. In einer anschließenden Erholungsphase von 5 Tagen wird das Neutralfett zu einem Teil ausgeschwemmt. Lipotrope Substanzen, während dieser Zeit verabreicht, beschleunigen den Abtransport.

Wir vergifteten daher 24 Albinoratten in der angegebenen Weise mit CCl_4 und gaben während der Erholungsphase 12 Tieren dreimal täglich 50 γ Glucagon in Glykokollpuffer intraperitoneal, und 12 Tieren dreimal täglich lediglich die gleiche Menge Glykokollpuffer. 1 Tier aus der Kontrollserie starb. Der Gewichtsverlust war bei beiden Gruppen gleich. Da die Untersuchungen nur orientierend gedacht waren, bestimmten wir lediglich den Gehalt der Leber an Gesamtlipoiden. Nach den von Hartmann und Mitarbeitern (1952, 1953) vorgelegten Zahlen lassen sich hieraus hinreichende Rückschlüsse auf den Neutralfettgehalt ziehen. Der Gehalt an Gesamtlipoiden betrug bei den Glucagontieren bei der Tötung 8,03% ($\sigma = 1{,}83$) und bei den Puffertieren 7,4% ($\sigma = 1{,}71$) vom Feuchtgewicht. Eine lipotrope Wirkung des Glucagon war in der gewählten Versuchsanordnung also nicht nachzuweisen.

Die histologische Untersuchung der Leber ergab ebenfalls keine Unterschiede hinsichtlich des Ausmaßes der Nekrosen, der Vacuolenbildung, der Mitosenhäufigkeit, der Verfettung und des Glykogenreichtums (Carminfärbung nach Best). Von Tier zu Tier wechselte das Bild zwar etwas, jedoch in beiden Gruppen in etwa gleicher Weise. Die Regeneration der geschädigten Leber wurde also durch Glucagonzufuhr nicht beschleunigt.

D. Erörterung der Befunde

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß es beim Meerschweinchen gelingt, durch verschiedene Substanzen morphologisch faßbare Veränderungen an den A-Zellen der Langerhansschen Inseln zu erzeugen. In wechselndem Ausmaß kommt es zu einer Degranulation und Vakuolisation des Cytoplasmas, wobei bei der $CoCl_2$ und Synthalinvergiftung die Vakuolisation und bei der Phosphor- und CCl_4-Vergiftung die Degranulation der A-Zellen im Vordergrund stehen. Die Chloroform- und Äthioninvergiftung führt lediglich zu einer A-Zelldegranulation. Bei der Ratte beschrieben Verne und Hébert (1951) nach Chloroformvergiftung

außer einer Degranulation eine Vakuolisation und einen Schwund der A-Zellen ähnlich wie nach Vergiftung mit Ammanita phalloides. Ob die vorwiegende Vakuolisation Zeichen einer zusätzlichen direkten Zellschädigung durch die Gifte ist, muß offen bleiben. Für sehr wahrscheinlich halten wir es jedoch nicht. Möglicherweise ist sie nur Folge einer besonders akuten Belastung der Zellen. Bei der Vergiftung durch Phosphor, Chloroform und Äthionin treten außerdem gehäufte A-Zellmitosen auf. Dieser Befund war nicht in allen Fällen zu erheben, was jedoch seine Bedeutung nicht herabsetzt. Wahrscheinlich hängt es vom Augenblick der Tötung ab, ob man in Teilung begriffene A-Zellen antrifft oder nicht. In der Nebennierenrinde des Meerschweinchens sieht man bei Aktivierung infolge Streß ebenfalls außerordentlich wechselnd viele Mitosen trotz völlig gleichartigen Versuchsbedingungen. — Charakteristischerweise bilden sich sämtliche geschilderten Veränderungen an den A-Zellen nur langsam im Verlaufe von 2—3 Tagen aus.

Nach IPTD-Gaben fehlen Degranulationen und Vakuolisationen völlig, dagegen kann man häufiger als normal Verklumpungen der α-Granula und Zellschrumpfungen beobachten. Kernpyknosen treten bei keiner der genannten Vergiftungen auf, dagegen verarmen die Kerne der degranulierten und vakuolisierten Zellen häufig an Chromatin.

An Kaninchen wurde von uns lediglich die Wirkung des Synthalin und IPTD untersucht. Das Synthalin A wirkt hier außerordentlich ähnlich wie beim Meerschweinchen und führt zu einer Vakuolisation der A-Zellen bei mäßiger Degranulation. Nach IPTD sind wiederum keine Degranulationen und Vakuolisationen der A-Zellen zu beobachten, dagegen sieht man häufig Granulaverklumpungen und Zellschrumpfungen und in einigen Fällen eine verminderte A-Zellzahl.

Bei der Ratte untersuchten wir die Wirkung des Synthalin, das zu einer Degranulation und Vakuolisation der A-Zellen führte.

Eine Analogie zu der bekannten cytotoxischen Wirkung des Alloxan und seiner Verwandten, die an den B-Zellen bereits nach wenigen Stunden zu Kernpyknosen und Plasmahomogenisierungen mit anschließender Resorption der nekrotischen Zellen innerhalb von 24 Std führen, besteht also bei den durch $CoCl_2$, Synthalin, Phosphor, CCl_4, Chloroform und Äthionin erzeugten A-Zellveränderungen nicht. Dem Einwand, daß es sich bei der Degranulation und Vakuolisation um eine für die A-Zellen charakteristische Degenerationsform handelt, kann entgegnet werden, daß das IPTD durchaus anders wirkt und daß Kadota und Midorikawa (1951) beim Kaninchen nach Natriumdiäthyldithiocarbamat an den A-Zellen ähnliche Schädigungen beobachten konnten, wie sie nach Alloxan an den B-Zellen auftreten. Vom morphologischen Standpunkt aus sind die Degranulation und Vakuolisation vielmehr als eine sekundäre Degeneration infolge pathologisch gesteigerter Zelltätigkeit zu werten,

zumal der gleiche Vorgang einer sekundären Degeneration an den B-Zellen bei gesteigertem Insulinbedarf (z. B. beim Young-Diabetes, bei Teilpankreatektomie und bei Überzuckerung) bekannt ist. Für diese Deutung spricht auch das Auftreten von Mitosen bei der Phosphor-, Chloroform- und Äthioninvergiftung, das man als Zeichen einer funktionellen Hyperplasie auffassen muß, sowie die Tatsache, daß die Degranulation und Vakuolisation nach $CoCl_2$ beim Meerschweinchen reversibel sind (Creutzfeldt und Schmidt, 1954). Die Möglichkeit einer Überanstrengung infolge abnormer Tätigkeit als Ursache der hydropischen Degeneration der A-Zellen nach Synthalin wurde bereits von Davis (1952) erörtert. Auch die Ähnlichkeit der A-Zellveränderungen bei Vergiftung durch völlig verschiedene Substanzen spricht für diese Annahme. Damit ergibt sich nun aber die Möglichkeit durch Aufsuchen einer allen Vergiftungsbildern gemeinsamen Organ- oder Stoffwechselschädigung Rückschlüsse auf die Funktion der A-Zellen bzw. des von ihnen produzierten Hormons zu ziehen, das ja wahrscheinlich zur Kompensation dieser extrapankreatischen Schädigungen vermehrt produziert wird.

Bevor wir uns jedoch dieser Frage zuwenden, müssen wir die von von Holt, Kröner und Kühnau (1954, 1955) vertretene Ansicht erörtern, daß Synthalin A und IPTD *primär* die A-Zellen schädigen und auf diesem Wege den Blutzucker senken. Nach den vorliegenden Untersuchungen kann keineswegs als erwiesen gelten, daß die Substanzen durch den gleichen Mechanismus wirken. Ihre hypoglykämische Wirkung ist jedoch sehr eindrucksvoll, und der Gedanke lag nahe, die neuerdings beobachtete A-Zellschädigung zu diesem Symptom in ursächliche Beziehung zu setzen.

Nach der Einführung des Synthalin A als Antidiabeticum durch Frank, Nothmann u. Wagner (1926) beschäftigten sich verschiedene Untersuchungen mit dem möglichen Wirkungsmechanismus dieser Substanz. Von Staub (1928), sowie Bodo u. Marks (1928) wurde eine erhebliche Schädigung der Leber durch Synthalin festgestellt und darauf hingewiesen, daß die Synthalinwirkung keine Ähnlichkeit mit der des Insulin habe. Synthalin verursacht nach Staub (1928) keine Glykogenablagerungen in der Muskulatur, wirkt auch an der isolierten Hundeleber glykogenolytisch, führt zu einer toxischen Schädigung des Zellstoffwechsels, senkt den Sauerstoffverbrauch und setzt anoxybiotisch aus Glucose Milchsäure frei. Übereinstimmend fanden Staub (1928), sowie Bodo u. Marks (1928) auch am durchströmten eviscerierten Tier und isolierten Muskelpräparat, also bei sicherer Abwesenheit des A-Zellsystems unter Synthalin eine Blutzuckersenkung. Dabei sinkt gleichzeitig der O_2-Verbrauch, der RQ steigt an und Milchsäure wird vermehrt freigesetzt (Bodo u. Marks, 1928).

Wenn das Synthalin über die A-Zellen blutzuckersenkend wirkt, dürfte die Hyperglykämie des pankreaslosen Hundes nicht durch Synthalingaben zu beeinflussen sein. Das ist jedoch möglich. Frank, Nothmann u. Wagner (1926) konnten den Diabetes des pankreaslosen Hundes durch Synthalin günstig beeinflussen. (10 mg/kg subcutan oder 20—30 mg/kg oral.) Auch Read u. Fodden (1954) sahen nach 10 mg/kg Synthalin subcutan bei pankreaslosen Hunden hypoglykämische

Schocks. Die negativen Ergebnisse von Rathery, Kourilsky u. Gibert (1928a) sowie Ralli u. Tiber (1929) beruhen offensichtlich auf einer zu niedrigen Synthalindosis (2—4 mg/kg oral). Denn diese Dosis ist auch am normalen Hund nicht sicher wirksam (Rathery, Kourilsky u. Gibert, 1928b).

Abgesehen von diesen älteren Untersuchungen spricht die Tatsache, daß $CoCl_2$ beim Meerschweinchen die gleichen Inselveränderung verursacht wie Synthalin, jedoch ohne den Blutzucker zu senken oder gar Schockzustände auszulösen (van Campenhout und Cornelis, 1951, Creutzfeldt und Schmidt, 1954) gegen die Annahme, daß die A-Zellschädigung Ursache der Synthalinhypoglykämie ist. Wie aus unseren Tabellen 6 und 7 hervorgeht, besteht außerdem beim Kaninchen zwischen der Blutzuckersenkung und dem Ausmaß der A-Zellschädigung keine Korrelation. Von einer regelmäßigen und vollständigen Ausschaltung des A-Zellsystems kann nicht die Rede sein. Dazu kommt, daß häufig hypoglykämische Schocks auftreten, bevor A-Zellveränderungen nachzuweisen sind. Hierin stimmen unsere Befunde mit denen von Davis (1952) vollkommen überein. Als Beweis gegen die Annahme, daß die A-Zellschädigung und der sich daraus ergebende Glucagonmangel Ursache der tödlichen Schocks sind, möchten wir unsere Experimente anführen, in denen wir durch stündliche hohe Glucagongaben den fraglichen Glucagonmangel zu kompensieren versuchten. Der einzige Effekt des Glucagon bestand überraschenderweise in einer Beschleunigung des Einsetzens von Schocksymptomen vermutlich durch vorzeitige Glykogenolyse in der Leber (vgl. Tab. 7). In Anbetracht der geringfügigen A-Zellveränderungen besteht auch keine Veranlassung, die Blutzuckersenkungen bei alloxandiabetischen Tieren nach Synthalin, die wir in gleicher Weise wie Fodden (1953) sowie von Holt und Mitarbeiter (1955b) sahen, auf eine Ausschaltung dieses Zellsystems zurückzuführen.

Die Tatsache, daß es sogar bei alloxandiabetischen Tieren nach Synthalin zu hypoglykämischen Schocks kommen kann (vgl. Tab. 6 sowie die Tabellen 1 und 2 bei von Holt und Mitarbeiter 1955b) spricht außerdem eindeutig für die Annahme, daß die Synthalinhypoglykämie extrapankreatischer Natur ist. Selbst bei völliger Ausschaltung der A-Zellen bliebe es nämlich unverständlich, warum bei den alloxandiabetischen (also B-zellenlosen) Tieren hypoglykämische Schocks auftreten. Denn in diesem Falle ist die Möglichkeit zu einer „unkompensierten Insulinwirkung", die von Holt und Kröner (1955c) als Ursache der Glykogenverarmung der Leber und der hypoglykämischen Erscheinungen bei synthalinvergifteten Normaltieren annehmen, doch gar nicht gegeben.

Ebenso unverständlich bliebe die Tatsache, daß einige alloxandiabetische Ratten von von Holt u. Mitarb. (1955b) im Anschluß an die Synthalinhypoglykämie wieder diabetische Blutzuckerwerte bekommen. Die bei anderen Tieren über Tage anhaltende Blutzuckernormalisierung läßt sich zwanglos durch

eine Leberschädigung und verminderte Freßlust erklären. Außerdem wären hier Untersuchungen über die Ausscheidungsdauer des Synthalin aufschlußreich.

Der Mechanismus der blutzuckersenkenden Wirkung des von Vonkennel und Kimmig (1941) synthetisierten IPTD ist ebenfalls Gegenstand mehrerer Untersuchungen gewesen.

Die Entdecker der hypoglykämischen Wirkung dieser Substanz konnten die Beobachtung machen, daß die bei Patienten unter IPTD auftredenden Hypoglykämien einem hohen Sulfonamidgehalt des Blutes parallel gingen (Janbon, Chaptal u. Schaap, 1942). Nach Absetzen des in der relativ niedrigen Dosis von 0,2 g/kg/Tag verabreichten Mittels normalisierten sich die Blutzuckerwerte. In den meisten Fällen reagierten die Patienten gut auf intravenöse Glucosezufuhr. 2 Patienten starben. Die Glucosegaben waren jedoch nicht sehr hoch. Experimentell wurde die Wirkung des IPTD zuerst von Loubatières (1942, 1944, 1946) an Hunden untersucht. Er fand nach einmaliger Gabe eine regelmäßige, jedoch reversible Blutzuckersenkung, die der Höhe des Sulfonamidspiegels im Blut parallel ging (0,4 g/kg oral oder subcutan). Wiederholte IPTD-Gaben führten zu einem schweren glykopenischen Zustand im Verlaufe einiger Tage, der durch Glucosezufuhr nicht mehr zu beheben war. Nach mehrtägigen IPTD-Gaben fand sich beim Hund ein zehnfach erhöhter Glykogengehalt der Leber. Zelluntergänge an den Langerhansschen Inseln wurden nicht gesehen. Nach Teilpankreatektomie wirkte IPTD blutzuckersenkend. Gleichzeitig stieg der RQ wie unter Insulingaben an. Beim pankreaslosen Hund und bemerkenswerterweise auch beim idiohypophysären Diabetes senkte IPTD den Blutzucker nicht. Beim mittelschweren Alloxandiabetes des Kaninchens ließ sich durch IPTD für die Dauer der Medikation die Glykosurie unterdrücken. Nach Absetzen des Mittels kehrte sie jedoch in gleicher Stärke wieder.

La Barre u. Reuse (1947) prüften die Wirkung des IPTD an alloxandiabetischen Hunden und fanden bei intravenöser Applikation beim leichten Diabetes eine geringe, beim schweren gar keine Blutzuckersenkung. Die Autoren kommen, wie Loubatieres, zu dem Schluß, daß IPTD vermittels einer Stimulation der Insulinsekretion den Blutzucker senkt und daher beim Fehlen der B-Zellen oder Erschöpfung derselben (wie beim idiohypophysären Diabetes) unwirksam ist. Nach Loubatieres (1946) ist der Wirkungsmechanismus des IPTD daher von dem des Synthalin grundsätzlich verschieden.

Von Holt, Kröner u. Kühnau (1954, 1955a und b) fanden jüngst erhebliche Veränderungen an den A-Zellen der Pankreasinseln nach IPTD bei Kaninchen und Ratten, allerdings mit einer Dosis, die 5—10 mal höher lag als die von den oben zitierten Autoren beim Menschen und Tieren angewandte. Bei Kaninchen hatten die A-Zellveränderungen keine Ähnlichkeit mit den nach Synthalin auftretenden Bildern. Es kam zu Kernpyknosen, Plasmahomogenisierungen und Schwund der Zellen. Die Abnahme der A-Zellzahl stand in den meisten Fällen in guter Korrelation zur klinisch beobachteten Hypoglykämie. Bei Ratten glich der morphologische Befund der A-Zellen dagegen der Synthalinwirkung (Degranulation und Vakuolisation). Nicht beweiskräftig erscheinen die Beobachtungen die die Autoren an einem mit IPTD vorbehandelten und anschließend mit Alloxan vergifteten Kollektiv von 17 Kaninchen gewannen. Denn die Tatsache, daß 5 Tiere in der initialen Hypoglykämie starben, 4 Tiere keine diabetische Endhyperglykämie bekamen und nur 8 Tiere einen normalen Alloxandiabetes entwickelten, bedarf keiner besonderen Erklärung durch eine unterschiedliche A-Zellschädigung infolge der IPTD-Vorbehandlung. Unseres Erachtens entsprechen diese Ergebnisse vielmehr dem bei der Alloxanisierung eines größeren Kollektivs gesunder Kaninchen zu erwartenden Ergebnis (vgl. Pincus, Hurwitz u. Scott, 1954).

In unseren Versuchen konnten wir bei Meerschweinchen und Kaninchen nach IPTD an zahlreichen A-Zellen über die Norm gehende Granulaverklumpungen nachweisen, die zu einer bisweilen erheblichen Schrumpfung der Zellen geführt hatten und bei einigen Kaninchen auch zu einer Abnahme der A-Zellzahl, die sich durch Auszählung nachweisen ließ (Tab. 7). Die Veränderungen waren besonders deutlich bei einigen mit CCl_4 vorbehandelten Kaninchen, was möglicherweise durch additive Wirkung der CCl_4- und IPTD-Vergiftung erklärt werden kann. Die A-Zellveränderungen entsprachen den von von Holt, Kröner und Kühnau (1955a) nach IPTD beschriebenen, haben jedoch nichts mit den Synthalinschäden gemeinsam und können nicht wie diese als Überfunktion und Erschöpfung (sekundäre Degeneration) gedeutet werden. Damit ergibt sich auch morphologisch eindeutig, daß Synthalin und IPTD durchaus verschieden wirken. Weil in vielen Fällen trotz Blutzuckersenkung die A-Zellveränderungen nur geringfügig waren oder gänzlich fehlten, ist eine Wirkung des IPTD über eine A-Zellausschaltung nicht erwiesen und die von Loubatières entwickelte These einer Stimulierung der Insulinsekretion sehr wohl denkbar. Die Begünstigung von Schocks nach vorheriger Schädigung der Leber durch CCl_4 wäre dann als erhöhte Insulinempfindlichkeit zu deuten. Auf ähnliche Weise könnte man die auffällige Beobachtung von Janbon, Chaptal und Schaap (1942) verstehen, daß von 16 Typhuskranken, die mit 0,2 g/kg/Tag IPTD oral behandelt wurden, 8 Patienten hypoglykämische Erscheinungen zeigten, während bei 12 sonstigen Infektionen, bei denen das Sulfonamid in gleicher Dosis gegeben wurde, nur einmal eine Hypoglykämie auftrat.

Grundsätzlich wäre hier noch zu sagen, daß eine Hypoglykämie nach A-Zellausschaltung insofern gar nicht erwartet werden kann, als der Ausfall der glucagonbildenden Zellen kein Grund zu einer Insulinabgabe ist. Denn die Insulinsekretion wird in erster Linie durch die Höhe des Blutzuckerspiegels reguliert (Grafe und Meythaler, 1927).

Wir können also bei unseren weiteren Betrachtungen das Synthalin als extrapankreatischwirkende und nur sekundär die A-Zellen affizierende Substanz betrachten und wollen das IPTD wegen seiner völlig andersartigen und noch ungeklärten Wirkungsweise aus unseren Erörterungen fortlassen.

Wir haben oben die Ansicht vertreten, daß die bei verschiedenen Intoxikationen zu beobachtende Degranulation und Vakuolisation der A-Zellen eine sekundäre Degeneration infolge funktioneller Überlastung darstellen. Es ergibt sich nun die Frage nach der gemeinsamen Noxe, die zum erhöhten Glucagonbedarf führt. Denn die Vergiftungsbilder sind recht bunt. Wir haben uns daher bemüht, die im Vordergrund stehenden Erscheinungen bzw. Organveränderungen isoliert auf ihre A-zellschädigende Wirkung zu untersuchen, selbst wenn sie nicht regelmäßig

trotz vorhandenen A-Zellveränderungen auftraten. So fehlt ja z. B. die Hypoglykämie bei der $CoCl_2$-, CCl_4-, $CHCl_3$- und Äthioninvergiftung und ist bei der Phosphorvergiftung nicht immer vorhanden. Lediglich bei der Synthalinvergiftung und nach Gaben von Ammanita phalloides (Verne, 1949) steht sie im Vordergrund. Durch möglichst kontinuierliche Blutzuckersenkungen mit Insulin über einige Tage gelang es uns in Bestätigung der Untersuchungen von Mohnike (1952) nicht, eine Degranulation und Vakuolisation der A-Zellen zu erzeugen. Während man die Vacuolenbildungen im Nebennierenmark bei schwerer Hypoglykämie (wir sahen sie vor allem beim Kaninchen nach Synthalin- und schwerer IPTD-Vergiftung und beim Meerschweinchen nach Synthalin- und Phosphorgaben) als Folge der abnorm gesteigerten Adrenalinproduktion deuten muß, besteht kein Grund, die Degranulation und Vakuolisation der A-Zellen als Folge der Hypoglykämie anzusehen.

Ein fast regelmäßiger Befund bei den von uns zur A-Zellschädigung erzeugten Vergiftungen ist sodann eine morphologisch sehr eindrucksvolle Aktivierung der Nebennierenrinde. Bereits Verne und Hébert (1951) machten auf die Parallelität zwischen A-Zelldegranulation und Fettüberladung der Nebennierenrinde bei experimentellen Leberverfettungen (Alkohol, Chloroform, Ammanita phalloides) aufmerksam. Daß hier jedoch eine ursächliche Verknüpfung vorliegt, möchten wir bezweifeln. Die Nebennierenrinden-Aktivierung dürfte lediglich Zeichen einer unspezifischen Belastung (Stress) sein, und ist nicht als Ursache der sekundären A-Zellendegeneration anzusehen, da wir selbst bei hochgradigen Nebennierenrinden-Aktivierungen anderer Genese (Penicillinvergiftung, Hungerstress, Skorbut) keine A-Zellveränderungen beobachten konnten.

Sämtlichen von uns untersuchten Vergiftungsbildern, die mit einer A-Zellschädigung einhergingen, war eine mehr oder weniger ausgeprägte Leberschädigung gemeinsam. Hierher wäre auch die von Verne (1949) beschriebene Ammanita phalloides-Vergiftung zu rechnen. Eine Parallelität zwischen dem morphologisch faßbarem Ausmaß der Leberschädigung und den A-Zellveränderungen besteht jedoch nicht immer, wie sich insbesondere bei der $CoCl_2$-Vergiftung zeigt (Creutzfeldt und Schmidt, 1954). Nicht jede Leberschädigung führt andererseits zu einer Überfunktion der A-Zellen. Das vorwiegend Lebernekrosen erzeugende Allylformiat ließ z. B. die A-Zellen intakt. Auch die einfache Fettleber scheint die A-Zellaktivität nicht zu beeinflussen, obwohl verschiedene Tatsachen diesen Gedanken nahelegen.

So scheint die alte Beobachtung, daß pankreaslose Hunde trotz Insulinzufuhr eine Fettleber bekommen (Allan u. Mitarb., 1924), die sich durch Verfütterung von Lipocaic (Dragstedt, van Prohaska u. Harms, 1936) oder von autoklaviertem Pankreas (Dragstedt u. Mitarb., 1954) rückgängig machen läßt, auf die Bedeutung der A-Zellen für die Leberverfettung hinzuweisen. S. H. Bensley u. Woerner

(1938) nahmen auf Grund ihrer Experimente an, daß die A-Zellen ein für den Fettstoffwechsel wichtiges Hormon produzieren, das allerdings nicht lipotrop wirkt. Sie sahen nach i.v. Gaben eines wäßrigen A-Zellextraktes beim Meerschweinchen eine Leberverfettung auftreten.

Nach unseren Erfahrungen möchten wir bezweifeln, daß schlechthin jede Leberverfettung die A-Zellen aktiviert. In Fällen von reiner Fettleber (Skorbuttiere) fanden wir keine Degranulation und Vakuolisation der A-Zellen. In speziell auf diese Fragen gerichteten Untersuchungen konnten wir auch keine lipotrope Wirkung des Glucagon nachweisen (kein beschleunigter Abtransport des Leberfettes nach CCl_4-Vergiftung unter Glucagon). Das Glucagon dürfte demnach nicht mit dem Lipocaic identisch sein, wie es neuerdings wieder Ziegler (1954) annimmt.

Daß die Beziehung des Glucagon zum Leberstoffwechsel jedoch eng sind, ergibt sich aus der Feststellung von Sutherland u. Cori (1951), daß Glucagon die Leberphosphorylase aktiviert. Die mangelhaften Kenntnisse, die wir zur Zeit noch über den Angriffspunkt der verschiedenen Leberparenchymgifte haben, erschweren aber die exakte Ermittlung des zur A-Zellüberfunktion führenden Faktors. Nach Eger (1955) spielen bei der Wirkung der Lebergifte Fermentstörungen der Leberzellen eine wesentliche Rolle. Es ist nun durchaus denkbar, daß bei den vielfältigen Aufgaben der Leber durch verschiedene Parenchymgifte die verschiedenen Funktionen unterschiedlich in Mitleidenschaft gezogen werden. Damit wäre zu erklären, daß nicht alle Lebergifte die A-Zellen aktivieren. Andererseits braucht sich eine Leberstoffwechselstörung unter Umständen morphologisch überhaupt nicht oder nur geringfügig zu manifestieren.

Die Annahme ist also durchaus berechtigt, daß allen Vergiftungen, die zu einer A-Zellschädigung im Sinne einer sekundären Degeneration führen, die Blockade eines bestimmten Stoffwechselablaufes zugrunde liegt, die der Organismus durch vermehrte Glucagonproduktion zu kompensieren versucht. Daß diese Kompensationsversuche frustran bleiben, spricht ebensowenig gegen die vorgetragene Hypothese wie unsere negativ ausgelaufenen Versuche, durch Glucagonzufuhr die Vergiftungsbilder günstig zu beeinflussen. Eine erfolgreiche Wirkung des vom Organismus selbst produzierten oder von außen zugeführten Glucagon ist vielleicht nur bei leichteren Schäden zu erwarten.

In Anbetracht der vorgelegten Befunde verdienen die Beziehungen zwischen Glucagon und Leberstoffwechsel jedenfalls weitere Beachtung.

Zusammenfassung

1. Die beim Meerschweinchen durch Synthalin neben charakteristischen Leberschäden verursachte Degranulation und Vakuolisation der A-Zellen der Langerhansschen Inseln wird als sekundäre Degeneration nach abnormer Belastung aufgefaßt. Die Synthalinhypoglykämie ist weder Ursache, noch Folge der A-Zellenschädigung, da $CoCl_2$ völlig gleichartige A-Zellenveränderungen verursacht, ohne den Blutzucker zu senken.

2. Sekundäre A-Zellenveränderungen (Degranulation, Vakuolisation, Mitosen) lassen sich bei experimenteller Leberschädigung durch Phosphor,

Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform und Äthionin nachweisen. Sie fehlen jedoch nach Vergiftung mit Allylformiat und bei der Skorbut-Fettleber. Nebennierenrindenaktivierung im Sinne eines Stress sowie langdauernde Blutzuckersenkung durch Insulin verändern die A-Zellen nicht.

3. Da bestimmte Störungen der Leberfunktion zu einem erhöhten Bedarf an A-Zellenhormon führen, wird geschlossen, daß dieses Hormon eine wesentliche Rolle im Leberstoffwechsel spielt. Durch Glucagongaben war die Wirkung der Gifte jedoch nicht zu beeinflussen, ebensowenig ließ sich ein lipotroper Effekt des Glucagon nachweisen.

4. Das Ausmaß der A-Zellenvakuolisation beim synthalinvergifteten Kaninchen steht in keiner Parallelität zum Zeitpunkt des Auftretens und zur Schwere der Hypoglykämie. Dauernde Glucagongaben vermögen die Synthalinwirkung nicht aufzuheben, sondern beschleunigen das Auftreten von hypoglykämischen Schocks. Da auch alloxandiabetische Kaninchen mit hypoglykämischen Schocks reagieren können, ist die Synthalinhypoglykämie nicht mit einer unkompensierten Insulinwirkung nach A-Zellenausschaltung zu erklären.

5. p-Aminobenzolsulfonamidisopropylthiodiazol (IPTD) wirkt an den A-Zellen durchaus anders (Plasmaverklumpung, Zellschrumpfung) als Synthalin. Eine Parallelität zwischen Ausmaß der A-Zellschädigung und Blutzuckersenkung nach IPTD besteht nicht. Vorherige Leberschädigung verstärkt die IPTD-Wirkung. Die zu einer A-Zellenschädigung notwendigen hohen IPTD-Dosen führen häufig zu zentral-nervösen Erscheinungen.

6. Schwere langdauernde Hypoglykämien verursachen Vakuolisationen im Nebennierenmark bei Kaninchen und Meerschweinchen.

Literatur

Allan, F. N., D. J. Bowie, J. J. R. Mcleod and W. L. Robinson: Brit. J. Exper. Path. **5**, 75 (1924). — Appel, W., K. J. Hansen u. J. Alslew: Z. exp. Med. **124**, 345 (1954). — Bargmann, W.: „Die Langerhansschen Inseln des Pankreas", Handb. d. mikroskop. Anat. d. Menschen Bd. VI, 2. Teil 197 (1939). — La Barre, J., u. J. Rense: Arch. Neerland. Physiol. **28**, 475 (1947). — Beiglböck, W., u. R. Clotten: Dtsch. Med. Wschr. **1955**, im Druck. — Bensley, S. H., u. C. A. Woerner: Anat. Rec. 72, Suppl. 413 (1938). — Bodo, R., u. H. P. Marks: J. Physiol. **65**, 83 (1928). — Bürger, M.: Z. Inn. Med. **2**, 311 (1947). — Cavallero, C., B. Malandra u. G. Galansino: Nature **173**, 585 (1954). — Creutzfeldt, W.: Beitr. pathol. Anat. **113**, 133 (1953); Klin. Wschr. **1954**, 819; — Creutzfeldt, W., M. Husten u. C. Haager: Beitr. path. Anat. **113**, 428 (1953). — Creutzfeldt, W., u. W. Schmidt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 487 (1954). — Creutzfeldt, W., u. E. Tecklenborg: Klin. Wschr. **1955**, 43. — Davis, J. C.: J. Path. Bact. **64**, 575 (1952). — Demole, V.: Z. Vitaminforsch. **3**, 89 (1934). — Dragstedt, L. R., J. van Prohaska and H. P. Harms: Am. J. Physiol. **117**, 175 (1936). — Dragstedt, L. R., J. S. Clarke, G. R. Rogers and P. V. Harper, jr.: Amer. J. Physiol. **177**, 95 (1954). — Duve De, Chr.: The Lancet **1953**, 99. — Eger, W.: Acta Hepatol. **3**, 1 (1955). — Eser, S., u. P. Tüzünkam: Istanbul Contrib. clin. Sci. **2**, 56 (1952). — Farber, E., M. V. Simpson and H. Tarver: J. Biol. Chem. **182**, 91

(1950). — Farber, E., and H. Popper: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **74**, 838 (1954). — Ferner, H.: Virch. Arch. **309**, 87 (1942); Virch. Arch. **319**, 390 (1951); Das Inselsystem des Pankreas, Stuttgart 1952. — Fodden, J. H.: Am. J. clin. Path. **23**, 1002 (1953). — Fodden, J. H., and W. O. Read: Endocrinology (Springfield, Jll.) **54**, 303 (1954). — Frank, E., M. Nothmann u. A. Wagner: Klin. Wschr. **1926**, 2100. — Goldner, M. G., B. W. Volk u. S. S. Lazarus: Metabol. **1**. 544 (1952); J. Clin. Endocrinol. **14**, 184 (1954). — Gomori, G.: Anat. Rec. **74**, Suppl. 1, 439 (1939); Am. J. Path. **17**, 395 (1941); Zit. nach Warren und Le Compte „Pathology of Diabetes mellitus" Philadelphia 1952, S. 58. — Grafe, E., u. F. Meythaler: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **125**, 181 (1927). — Hagedorn, H. C., u. B. N. Jensen: Biochem. Z. **135**, 46 (1923). — Hartmann, F.: Klin. Wschr. **1953**, 720. — Hartmann, F., R. Hertel, G. Schulze u. W. Wellmer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 152 (1952). — Hess, W.: Schweiz. Z. Path. **9**, 46 (1946). — Hoerr, N.: Am. J. Anat. **48**, 139 (1931). — Holt, C. v., L. v. Holt: Z. Naturforsch. **9** b, 319 (1954). — Holt, C. v., L. v. Holt, B. Kröner u. J. Kühnau: Naturwiss. **41**, 166 (1954); Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 66—77 (1955a); Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 78—94 (1955b). — Holt, C. v., L. v. Holt u. B. Kröner: Dtsch. med. Wschr. **1955**, 648. — Ingle, D. J., D. F. Beary and A. Purmalis: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **85**, 432 (1954). — Janbon, M., J. Chaptal, A. Vedel et J. Schaap: Communications Soc. sci. Med. biol. Montpellier **1942**, 222. — Janbon, M., P. Lazerges et J. H. Metropolitanski: Communications Soc. sci. med. biol. Montpellier **1942**, 212; Presse medic. **3**, 37 (1943). — Kadota, I., u. O. Midorikawa: J. Labor. a. Clin. med. **38**, 671 (1951). — Kühnau, J.: Krankheiten des Kohlenhydratstoffwechsels in Handb. inn. Med. 4. Aufl., VII, 2, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1955. — Lazarus, S. S., M. G. Goldner u. B. W. Volk: Metabol. **2**, 513 (1953). — Levine, M., and J. V. Fopeano: J. Biol. Chem. **202**, 597 (1953). — Loubatières, A.: 43e Congrès des méd. alién. neurol. de France. Montpellier 1942; C. R. soc. Biol. **138**, 830 (1944); Thèse Doctorat es-sciences naturelles. Montpellier 1946; Arch. Int. Physiol. **54**, 174 (1946). — Mohnike, G.: Z. exp. Med. **120**, 23 (1952). — Pincus, I. J., J. J. Hurwitz u. M. E. Scott: Proc. exp. Biol. Med. **86**, 553 (1954). — Pincus, I. J., and J. Z. Rutman: Arch. Int. Med. **92**, 666 (1953). — Raja Rama Rao, M. R., u. N. N. De: Acta Endocrinol. **18**, 293 (1955). — Ralli, E. P., and A. M. Tiber: J. Pharmakol. a. Exper. Ther. **37**, 451 (1929) — Rathery, F., R. Kourilsky et S. Gibert: C. r. Soc. Biol. (Paris) **99**, 282 (1928a); C. r. Soc. Biol. (Paris) **99**, 284 (1928b). — Read, W. O., u. J. H. Fodden: Metabolism. **3**, 456 (1954). — Root, M. A., J. Ellis and A. Staub: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **85**, 507 (1954). — Root, M. A.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **87**, 108 (1954). — Seifert, G.: Virch. Arch. **325**, 379 (1954). — Staub, H.: Z. klin. Med. **107**, 607 (1928). — Sutherland, E. W., u. C. F. Cori: J. Biol. Chem. **188**, 531 (1951). — Terbrüggen, A.: Virch. Arch. **315**, 407 (1948). — Tonutti, E.: Z. mikrosk.-anat. Forsch. **52**, 32 (1942). — Tonutti, E., u. K. H. Matzner: Klin. Wschr. **1950**, 516. — Van Campenhout, E., et G. Cornelis: C. r. Soc. Biol. (Paris) **145**, 933 (1951); Bull. Acad. Méd. Belg. **16**, 382 (1952). — Van Ittalie, Th. B., M. C. Morgan u. L. B. Dotti: J. Clin. Endocrinol. **15**, 28 (1955). — Verne, J.: C. r. Soc. Biol. **143**, 668 (1949). — Verne, J., u. S. Hebert: C. r. Soc. Biol. (Paris) **145**, 818 (1951). — Volk, B. W., S. S. Lazarus and M. G. Goldner: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **82**, 406 (1953); Arch. Int. Med. **93**, 87 (1954). — Vonkennel, J. u. J. Kimmig: Klin. Wschr. **1941**, 2. — Vuylsteke, Ch. A., G. Cornelis u. Chr. De Duve: Arch. internat. Physiol. **60**, 105 (1952). — Weitzel, G., F. J. Strecker, U. Roester, A. M. Fretzdorff u. E. Buddecke: Z. physiol. Chem. **295**, 83 (1953). — Ziegler, E.: Bull. Galen. **17**, 10, 68, 132 (1954).

Dr. Werner Creutzfeldt, Freiburg/Br., Med. Univ.-Klinik

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 62—70 (1955)

Aus der II. Medizinischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. W. Grunke) und dem Hygienischen Institut (Direktor: Prof. Dr. W. F. Winkler) der Martin Luther-Universität Halle-Wittenberg

Der Einfluß von Vitamin E, Methionin und Corhormon auf die experimentelle Meerschweinchentuberkulose

Von

H. zur Horst-Meyer und J. Potel

(Eingegangen am 27. Juli 1955)

Wiederholt ist versucht worden, die Vitamine mit in die Behandlung der Tuberkulose einzubeziehen. Aus dem umfangreichen Schrifttum geht hervor, daß ein Einfluß von Lactoflavin, Pantothensäure, Nicotinsäureamid, Phthiocol und dem Vitamin B-Komplex auf die Entwicklung einer Tuberkulosebakterienkultur nicht nachgewiesen werden kann[43, 44]. Auch Thiamin sowie Vitamin A und P beeinflussen das Wachstum nicht. Vitamin K soll gering hemmen[32]. Ein Einfluß des Vitamin D_2 im Sinne einer Hemmung des Bakterienwachstumes ist von Raab beobachtet[35], von Dierijick jedoch nicht bestätigt worden[8]. Wie sehr der Einfluß der Vitamine auf das Bakterienwachstum zugleich auch von der Wahl des Nährbodens abhängt, geht aus den interessanten Versuchen von Urabe u. Yuge[42] hervor. Sie stellten fest, daß das Wachstum auf Kirchner-Nährböden durch Zusatz von Vitamin K_3 nicht nur gehemmt, sondern bei geeigneter Konzentration ($2 \cdot 10^{-4}$) sogar verhindert werden kann. Auf Glycerin-Schrägagar mit K_3-Zusatz ($2 \cdot 10^{-7}$) zeigen Typus humanus und Typus gallinaceus ein beschleunigtes Wachstum. Der hemmende bzw. beschleunigende Einfluß ließ sich auf Eiernährböden nicht nachweisen.

Die Tuberkulinreaktion wird im Mantoux-Test durch Vitamin B und C verstärkt, während die Pirquet-Reaktion durch Vitamin A und D abgeschwächt wird[1].

Aus der Klinik ist bekannt, daß der Vitaminbedarf des an Tuberkulose erkrankten Körpers gesteigert ist[20, 23]. Jedoch wird der therapeutische Effekt einer Vitaminsubstitutionsbehandlung sehr unterschiedlich beurteilt. Ein entscheidender Einfluß des Vitamin A auf den klinischen Ablauf der Tuberkulose kann nicht bestätigt werden[4, 29]. Ähnlich lauten die Berichte über Vitamin B[4, 29]. Vitamin C hat auf Tuberkulin eine inaktivierende Wirkung[12, 37]. Im Tierversuch ist Vitamin C in der Lage die Folgen der Tuberkuloseinfektion abzuschwächen und das Fortschreiten einer generalisierten Tuberkulose zu verzögern[5, 7, 13, 29, 37].

Vitamin D ist in die Behandlung des Lupus durch Charpy eingeführt worden[7] und ist den bis dahin verwendeten Behandlungsmethoden überlegen[40]. Abgesehen von dieser Sonderform der Tuberkulose ist Vitamin D auch bei den übrigen Tuberkuloseformen angewandt worden. Pleuritis exsudativa[25]; Lungentuberkulose[25, 39];

miliarer Tuberkulose[37]; Peritonitis tuberculosa[9]; Drüsentuberkulose[34]. So überzeugend der Einfluß des Vitamin D auf den Lupus ist, so wenig einheitlich werden die Erfolge bei den übrigen Formen beurteilt[41].

Im Gegensatz zu dem sehr umfangreichen Schrifttum über die oben angeführten Vitamine liegen über den Einfluß des Vitamin E auf die Tuberkulose oder anderer Infektionen nur wenige Arbeiten vor. JOLLER geht in seiner Dissertationsarbeit der Frage nach, ob ein Mangel oder ein Überschuß von Vitamin E von Einfluß auf das Infektionsgeschehen im allgemeinen sei[22]. Im Mäuseversuch kann durch Vitamin E-Gaben (Ephynal Roche) der letale Ausgang einer Schweinerotlauf- oder Hühnercholerainfektion hinausgeschoben werden. Beim Meerschweinchen verläuft die experimentelle BANG-Infektion unter Vitamin E-Mangelkost schwerer als bei normal ernährten Tieren. Meerschweinchen, die mit dem Tuberkulosestamm Mycobact. tub. bov. infiziert waren, wiesen ein schwereres Krankheitsbild auf, wenn sie zugleich Vitamin E-arm ernährt wurden. Aus der Klinik liegen Arbeiten von LOHEL[24] über den günstigen Einfluß des Vitamin E auf die Tuberculosis cutis luposa bei 10 Kranken und Tuberculosis cutis coll. bei 3 Kranken vor. NEVINNY-STICKEL[30] rät auf Grund einer Einzelbeobachtung bei einem Fall von oberer Genitaltuberkulose neben der chemotherapeutischen Behandlung zu einer zusätzlichen Applikation von Vitamin E.

Es lag daher nahe zu klären, ob Vitamin E auf die Tuberkulosebakterien selbst einen Einfluß ausübt bzw. ob es in der Lage ist, das Tuberkulosegeschehen beim Tier zu beeinflussen. Zu diesem Zweck wurden folgende Versuchsreihen angesetzt:

A. In vitro. Einfluß von α-Tokopherolphosphat auf das Wachstum von Tuberkulosebakterienkulturen.

B. In vivo Reihe I—III. Einfluß von α-Tokopherolacetat auf den Ablauf einer Tuberkuloseinfektion mit dem BCG-Stamm bzw. mit Myc. tuberc. Stamm H 37 Rv in verschiedenen Infektdosen beim Meerschweinchen.

Reihe IV. Einfluß zweier lipotroper Stoffe (Methionin, Corhormon) auf den Ablauf einer Tuberkuloseinfektion mit Myc. tuberc. Stamm H 37 Rv beim Meerschweinchen.

Methodik

Zu A. Es wurden fallende Verdünnungen von 1000—0,5 γ/ml wasserlöslichem α-Tokopherolphosphat dem Bromkresolpurpur-Nährboden nach WAGNER-MITSCHERLICH beigemischt. Die Nährböden wurden mit einer Normalöse von 2 mm ⌀ mit einer Suspension von Reinkulturen verschiedener frisch aus Sputen isolierter Tuberkulosebakterien (Tbk-Bakt.) vom Typ humanus (1,0 mg in 1,0 ml NaCl) beimpft. Die Ablesung erfolgte nach einer Bebrütung von 21 Tagen. Bei allen 4 Stämmen (Nr. 796, 838, 863, 896) zeigte sich kein Einfluß des α-Tokopherolphosphat, unabhängig von der Konzentration, auf das Wachstum der Tbk-Bkt., weder im Sinne einer Hemmung noch einer Förderung.

Zu B, Reihe I. 30 Tuberkulin negative Meerschweinchen (M) (20 Männchen und 10 Weibchen) mit einem Gewicht von etwa 250 g wurden je Tier mit 0,5 mg einer 4 Wochen alten Subkultur eines BCG-Stammes auf Bromkresolpurpur-Nährboden subcutan in die Kniefalte infiziert.

Serie a). 15 Tiere (10 Männchen, 5 Weibchen) liefen unbehandelt als Leerkontrolle.

Ergebnis der Versuchsreihe I.

Tabelle 1

Serie a) (Leerkontrolle)				Serie b) (Vitamin E-Tiere)				
MS-Nr. Geschlecht	Sektionsbefund			MS-Nr. Geschlecht	Vitamin E Gesamtmenge mg	Sektionsbefund		
	Leber	Milz	Drüsen			Leber	Milz	Drüsen
					intercur. n. 19 Tg. gest.			
1 m.	0	0	+	1 m.	75	0	0	0
					intercur. n. 26 Tg. gest.			
2 m.	0	0	+	2 m.	105	0	0	0
3 m.	0	0	+	3 m.	180	0	0	0
4 m.	0	0	+	4 m.	180	0	0	0
5 m.	0	0	+	5 m.	180	0	0	0
6 m.	0	0	0	6 m.	180	0	0	0
7 m.	0	0	0	7 m.	180	0	0	0
8 m.	0	0	0	8 m.	180	0	0	0
9 m.	0	0	0	9 m.	180	0	0	0
intercur. n. 28 Tg. gest.								
10 m.	0	0	0	10 m.	180	0	0	0
					intercur. n. 36 Tg. gest.			
11 w.	0	0	+	11 w.	165	0	0	0
12 w.	0	0	0	12 w.	180	0	0	0
13 w.	0	0	0	13 w.	180	0	0	0
14 w.	0	0	0	14 w.	180	0	0	0
15 w.	0	0	0	15 w.	180	0	0	0

Serie b). 15 Tiere (10 Männchen, 5 Weibchen) erhielten 2mal wöchentlich 15 mg α-Tokopherolacetat (Ephynal forte Roche, 0,05 ml/Dosis) i. m.

Sektion der überlebenden Tiere nach 6 Wochen, nachdem die Tuberkulintestung (0,1 ml „Tuberkulin-Dessau" 1:100) i. c. appliziert, positiv ausgefallen war.

Ergebnisse siehe Tab. 1.

Reihe II. 30 Tuberkulin negative Meerschweinchen (20 Männchen und 10 Weibchen) mit einem Gewicht von etwa 250 g wurden je Tier mit 0,1 mg einer 4 Wochen alten Subkultur von Mycobact. tuberc. Stamm H 37 Rv auf Bromkresolpurpur-Nährboden s. c. in die Kniefalte infiziert.

Serie a). 15 Tiere (10 Männchen, 5 Weibchen) liefen unbehandelt als Leerkontrolle.

Serie b). 15 Tiere (10 Männchen, 5 Weibchen) erhielten 2mal 15 mg α-Tokopherolacetat pro Woche wie in Reihe I i. m.

Sektion der überlebenden Tiere 6 Wochen nach Infektion. Ergebnisse siehe Tab. 2.

Reihe III. 20 Tuberkulin negative männliche Meerschweinchen von etwa 200 g Gewicht erhielten 0,15 mg einer 4 Wochen alten Subkultur von Mycobact. tuberc. Stamm H 37 Rv. auf Bromkresolpurpur-Nährboden s. c. in die Kniefalte infiziert.

Serie a). 10 Tiere liefen unbehandelt als Leerkontrolle.

Serie b). 10 Tiere erhielten 2mal wöchentlich 15 mg α-Tokopherolacetat wie in Reihe I i. m.

Sektion der Tiere 6 Wochen nach Infektion. Ergebnisse siehe Tab. 3.

Ergebnis der Versuchsreihe II.

Tabelle 2

Serie a) (Leerkontrolle)				Serie b) (Vitamin E-Tiere)				
MS-Nr. Geschlecht	Sektionsbefund			MS-Nr. Geschlecht	Vitamin E Gesamtmenge mg	Sektionsbefund		
	Leber	Milz	Drüsen			Leber	Milz	Drüsen
					intercur. n. 11 Tg. gest.			
1 m.	+	+	+	1 m.	60	0	0	0
					intercur. n. 23 Tg. gest.			
2 m.	+	+	+	2 m.	120	0	0	0
					intercur. n. 31 Tg. gest.			
3 m.	+	+	+	3 m.	150	+	+	+
4 m.	+	+	+	4 m.	180	+	+	+
5 m.	+	+	+	5 m.	180	+	+	+
6 m.	+	+	+	6 m.	180	0	+	+
7 m.	0	+	+	7 m.	180	0	+	+
8 m.	0	+	+	8 m.	180	0	0	+
9 m.	0	+	+	9 m.	180	0	0	+
10 m.	0	0	+	10 m.	180	0	0	+
11 w.	+	+	+	11 w.	180	+	0	+
12 w.	+	+	+	12 w.	180	0	0	+
13 w.	+	+	+	13 w.	180	0	+	+
14 w.	+	+	+	14 w.	180	0	0	+
15 w.	+	+	+	15 w.	180	0	+	+

Ergebnis der Versuchsreihe III.

Tabelle 3

Serie a) (Leerkontrolle)				Serie b) (Vitamin E-Tiere)				
MS-Nr. Geschlecht	Sektionsbefund			MS-Nr. Geschlecht	Vitamin E Gesamtmenge mg	Sektionsbefund		
	Leber	Milz	Drüsen			Leber	Milz	Drüsen
1 m.	+++	+++	+++	1 m.	180	++	+	+
2 m.	+++	+++	++	2 m.	180	+	+++	+++
3 m.	+++	++	+++	3 m.	180	(+)	+	++
4 m.	+++	+++	+	4 m.	180	(+)	+	+++
5 m.	+++	++	++	5 m.	180	(+)	+	+
6 m.	+++	++	++	6 m.	180	(+)	++	+
7 m.	+++	++	++	7 m.	180	0	(+)	+
8 m.	+++	+	++	8 m.	180	0	(+)	+
9 m.	+++	+	+	9 m.	180	0	++	+
10 m.	+++	+	++	10 m.	180	0	++	+

Ergebnisse der Versuchsreihen

(Der Grad der makroskopisch sichtbaren tuberkulösen Veränderungen wurde in der Zahl der Kreuze ausgedrückt.)

Aus den vitro-Versuchen geht hervor, daß α-Tokopherolphosphat in einer Konzentration von 1000 γ—0,5 γ/ml auf das Wachstum von Reinkulturen verschiedener frisch aus Sputum isolierter Tuberkulosebakterien bei Verwendung von Bromkresolpurpur-Nährböden weder einen hemmenden noch einen fördernden Einfluß hat.

Besprechung der Ergebnisse

Aus den vitro-Versuchen geht hervor, daß bei der von uns gewählten Versuchsanordnung ein Einfluß von α-Tokopherolphosphat, das als wasserlösliche Substanz dem Nährboden in einer Konzentration von 1000-0,5 γ/ml zugesetzt werden konnte, auf das Wachstum von Tuberkulosebakterienkulturen nicht nachgewiesen werden konnte.

Im Gegensatz dazu ist das α-Tokopherolphosphat (Ephynal forte Roche) in der Lage, die Folgen einer Tuberkuloseinfektion beim Meerschweinchen abzuschwächen. Nach der Einimpfung des wenig virulenten Stammes BCG wiesen die mit Vitamin E behandelten Tiere 6 Wochen nach der Infektion in keinem Falle eine makroskopisch erkennbare Tuberkulose der regionären Lymphdrüsen, der Leber oder der Milz auf. Der in Reihe II verwendete Stamm H 37 Rv ließ 6 Wochen nach der Infektion im Leerversuch bei allen Tieren einen Befall der regionären Lymphdrüsen erkennen, jedoch besteht hier bereits ein Unterschied in der Schwere des Leberbefalles. 11 von 15 Tieren die nicht mit Vitamin E behandelt worden waren, wiesen auf der Leberoberfläche vereinzelte weiße, stecknadelkopfgroße Tuberkelknötchen auf. Im Gegenatz dazu konnten wir diese Veränderungen bei den mit Vitamin E behandelten Tieren nur in 4 von 13 Fällen nachweisen. Auch die Milz ist bei den mit Vitamin E behandelten Tieren weniger befallen als bei den Kontrolltieren. Bei Steigerung der injizierten Bakterienmenge in Reihe III verlief das Krankheitsbild entsprechend der massiveren Infektion bei allen Tieren ausgeprägter, doch kam auch hier der Schutzeffekt des Vitamin E auf den Infektionsablauf, insbesondere auf den Befall der Leber und Milz deutlich zum Ausdruck.

Diese Eigenschaft des α-Tokopherol ist bisher unbeachtet geblieben. Eine sichere Erklärung für diese Wirkung können wir auf Grund der vorliegenden experimentellen und klinischen Forschungsergebnisse nicht geben. Aus der Vielzahl der Einzelbeobachtungen käme eventuell für die Erklärung der oben beschriebenen Schutzwirkung die lipotrope Eigenschaft des Vitamin E in Frage.

Bei Vitamin E-Mangel kommt es in der Leber zu Nekrosen[38] und zur Ablagerung von Steroidpigmenten[26] kombiniert mit Anreicherung von Peroxyden. Das Vitamin greift in die Phosphoryllierungsprozesse[44] und in den Kohlehydrathaushalt[6, 9, 19] ein. Auch für die Synthese von Lipoiden und Fetten in der Leber soll es von Bedeutung sein[27]. Alimentäre Leberschäden können durch Vitamin E abgeschwächt oder verhindert werden[16, 18, 36]. Im Tierexperiment hat es bei der Tetrachlorkohlenstoffvergiftung eine lipotrope Wirkung[17]. Es liegt also nahe, die von uns beobachtete Schutzwirkung des Vitamin E bei der Tuberkuloseinfektion, insbesondere den Leberschutz auf diese lipotrope Eigenschaft des Vitamin E zu beziehen, zumal Leberparenchymschäden bei Tuberkulose auftreten können.

Zur Prüfung dieser Hypothese haben wir auf Vorschlag von Herrn Professor Emmrich in einer weiteren Untersuchungsserie 2 lipotrope Stoffe auf ihre Schutzwirkung bei der experimentellen Tuberkulose geprüft. Aus der Gruppe dieser Stoffe haben wir Methionin (Thiomedon-Homburg)[10, 14, 15, 21, 28] und Corhormon*[11, 31] ausgewählt. Trotz gleichen Effektes im Hinblick auf seine lipotrope Wirkung besteht eine unterschiedliche Wirkungsweise dieser beiden Stoffe. Methionin verhindert das Einwandern von Fett in die Leber nicht, fördert jedoch seinen Abbau. Im Gegensatz dazu verhinhert Corhormon von vornherein das Einwandern des Fettes[11]. Emmrich bezieht den Corhormon-Effekt auf den Magnesiumgehalt des Präparates und vermutet einen Einfluß des Magnesium auf das Fermentsystem im Sinne Lettrés.

Methodik

Zu B. *Reihe IV*. 32 Tuberkulin negative männliche Meerschweinchen von etwa 250 g Gewicht erhielten wie bei Reihe III 0,15 mg einer 4 Wochen alten Subkultur von Mycobact. tuberc. Stamm H 37 Rv auf Bromkresolpurpur-Nährboden s. c. in die Kniefalte infiziert.

Serie a) 10 Tiere liefen unbehandelt als Leerkontrolle.
Serie b) 10 Tiere erhielten täglich 0,5 ml Methionin s. c. (Thiomedon).
Serie c) 10 Tiere erhielten täglich 2,0 ml Corhormon s. c.
Serie d) 2 Tiere erhielten 2mal wöchentlich 15 mg α-Tokopherolacetat i. m.
Sektion der überlebenden Tiere nach 6 Wochen.

Ergebnis der Versuchsreihe IV.

Zusammenfassung der histologischen Untersuchungsergebnisse der Leber aus der Versuchsreihe IV.

Bei allen Tieren findet sich eine erhebliche, vorwiegend interstitiell tuberkulöse Hepatitis mit Störung des normalen Aufbaues (Umbau).

Ebenso finden sich in den meisten Präparaten Nekrosen und Nekrobiosen, vielfach größerer Zellgruppen, jedoch oft auch einzelner Zellen. Auch treten Wucherungen von Gallengängen auf, so daß das Bild einer subakut bis chronisch verlaufenden Cirrhose entsteht.

Daneben stellt sich vorwiegend bei den mit Thiomedon aber auch bei den mit Corhormon behandelten Tieren eine blasig-vacuolige Entmischung des Plasmas dar, die nicht mit degenerativen Veränderungen am Zellkern parallel geht und oft zur Schwellung der Leberzelle führt. Die übrigen Veränderungen sind bei allen

* Corhormon = Standardisierter Extrakt aus embryonalen Tierherzen.

Versuchsgruppen in annähernd gleicher Stärke vorhanden. Die Nekrosen sind bei Corhormon und Vitamin E geringer. Bei Vitamin E finden sich im Gegensatz zu den übrigen Versuchsgruppen fast nur produktive Tuberkel.

Tabelle 4

MS-Nr. Geschlecht	Serie a) Leerversuch Sektionsbefund			Serie b) Methionin Sektionsbefund			Serie c) Corhormon Sektionsbefund			Serie d) Vitamin E Sektionsbefund		
	Leber	Milz	Drüsen	Leber	Milz	Drüsen	Leber	Milz	Drüsen	Leber	Milz	Drüsen
1 m.	+++	++	(+)	+++	+++	+	+++	+	++	0	0	+
2 m.	+++	+	++	+++	+	+	+++	+	+	0	+	++
3 m.	+++	+++	+	++	+	++	++	++	+			
4 m.	++	+	+	++	++	++	++	++	++			
5 m.	++	+	++	++	++	+	+	+	++			
6 m.	+	++	++	++	++	+	+	+	+			
7 m.	++	++	++	++	++	+	+	+	+			
8 m.	++	+	++	++	+	+	+	+	+			
9 m.	++	+	+	++	+	+	+	+	+			
10 m.	0	0	++	++	+	+	+	0	+			

Folgende Tiere verstarben interkurrent an folgenden Tagen: Serie a) Tier 6 am 36. Tag; Serie b) Tier 4 am 37. und Tier 5 am 40. Tag; Serie c) Tier 1 und 2 am 42. Tag.

Besprechung der Ergebnisse

Aus der Versuchsreihe IV geht hervor, daß Methionin in einer Dosierung von 0,1 g täglich bei etwa 200 g schweren Meerschweinchen über 6 Wochen gegeben im Vergleich zu den Kontrolltieren keinen Einfluß auf den Ablauf der experimentellen Meerschweinchentuberkulose hat. Die Tiere machten einen schwer kranken Eindruck, waren abgemagert und struppig im Fell und neigten zu Durchfällen. Der makroskopisch erkennbare Befall der regionären Lymphdrüsen, der Leber und Milz war der gleiche, wie bei den Kontrolltieren. Im histologischen Bild fiel neben den schweren Destruktionsveränderungen eine Vacuolenbildung der Leberzellen auf, die nicht durch Fetttröpfchenbildung bedingt war. Bei diesen Zellen war der Zellkern jedoch im wesentlichen unverändert.

Wie bereits aus den Versuchsreihen I—III hervorging, erwies sich auch diesmal das Vitamin E als geeignet eine gewisse Schutzwirkung auf das Meerschweinchen vor der Tuberkuloseinfektion auszuüben. Die Tiere sahen wohl und gut genährt 6 Wochen nach der Infektion aus. Das Fell war glatt und glänzend. Makroskopisch waren an der Leberoberfläche keine Tuberkeln erkenntlich. Milz und regionäre Lymphdrüsen waren gering befallen. Die Nekrosen im histologischen Präparat waren wenig ausgedehnt. Die Tuberkulose verlief im Gegensatz zu den übrigen Versuchsserien mehr produktiv.

Auch Corhormon (2,0 ml pro Tier täglich s. c.) bietet einen Schutz vor der experimentellen Tuberkulose. Er ist jedoch weniger ausgeprägt als der Schutz, den Vitamin E bietet.

Der makroskopisch erkennbare Befall von Milz und Leber ist geringer als im Leerversuch. Auch die Nekrosen der Leber sind weniger ausgedehnt. Allgemein machten die Tiere einen besseren Eindruck als die Kontrolltiere.

Zusammenfassung

α-Tokopherolphosphat einem Tb-Nährboden in Mengen von 1000 bis 0,5 γ% zugesetzt hat keinen Einfluß auf das Wachstum von Tuberkulosebakterien.

Im Tierversuch schwächt α-Tokopherolacetat die Wirkung eines Tuberkuloseinfektes beim Meerschweinchen deutlich ab. Gegenüber den unbehandelten Tieren sind die mit Vitamin E behandelten Tiere 6 Wochen nach der Infektion in gutem Ernährungszustand. Die Leber und die Milz weisen an ihrer Oberfläche weniger Tuberkel als die Kontrolltiere auf. Auch die durch die Tuberkulose auftretenden Leberparenchymschäden sind bei den mit Vitamin E behandelten Tieren weniger ausgedehnt. Die Tuberkulose verlief produktiv.

In der Annahme, daß eventuell die lipotrope Eigenschaft des Vitamin E als maßgebender Faktor in Frage käme, haben wir Methionin und Corhormon, deren lipotrope Eigenschaft bekannt ist, ebenfalls im Versuch geprüft. Dabei wies Corhormon noch eine erkennbare Schutzwirkung auf; Methionin hingegen hat in der von uns durchgeführten Versuchsanordnung keinen Einfluß auf den Ablauf der experimentellen Tuberkulose.

Wir schließen daraus, daß bei dem Vitamin E außer der lipotropen Wirkung weitere Faktoren eine Rolle spielen, die die Verlaufsform der experimentellen Tuberkulose bestimmen und die Folgen einer Tuberkuloseinfektion beim Meerschweinchen abschwächen.

Der Deutschen Hoffmann-La Roche A. G. danken wir für die freundliche Überlassung der für diese Versuche notwendigen Mengen von α-Tokopherolphosphat sowie α-Tokopherolacetat.

Ebenso danken wir der Homburg A. G. für die freundliche Überlassung der hierfür notwendigen Mengen Corhormon und Thiomedon (Methionin „Homburg").

Literatur

[1] Athénes, P. E.: Rev. Tuberc. (Paris) **1950**, 862. — [2] Bell, H.: Brit. Med. J. **1949**, I, 139. — [3] Bomskov, C., u. K. N. v. Kaulla: Klin. Wschr. **1941**, 334. — [4] Bretey, J.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **134**, 324 (1940). — [5] Bretey, J.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **136**, 327 (1942). — [6] Butturini, U.: Clin. med. ital. **26**, 90 (1945). — Giorn. Clin. med. **1950**, 1. — [7] Charpy, J.: Bull. Acad. roy. Méd. belg. **131**, 522 (1947). — [8] Dierijick, J.: Rev. belge Path. **21**, 294 (1952). — [9] Ellmann, Ph., u. J. Anderson: Brit. Med. J. **1948**, I, 394. — [10] Emmrich, R.: Klin. Wschr. **29**. 82 (1951). — [11] Emmrich, R., u. H. Petzold: Arch. exper. Path. u. Pharmakol,

214, 333 (1952). — [12] Fernbach, E., et G. Rullier: C. r. Acad. Sci. (Paris) **212**, 960 (1941). — [13] Gangadharem, P. R. J., and M. Sirsi: Indian J. Med. Sci. **7**, 196 (1953). — [14] Glynn, L.E., H.P. Himsworth and H. Neuberger: Brit. J. Exper. Path. **26**, 326 (1945). — [15] Griffith, W. H.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **41**, 333 (1939). — [16] György, P.: zit. bei Sylvio Markees, Intern. Z. Vitaminforsch. **1950**, H. 3, 335. — [17] Hartmann, F., R. Hertel, G. Schulze u. H. Wellmer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 152 (1952). — [18] Himsworth, H. P., and D. Lindan: Nature (Lond.) **1949**, 30. — [19] Hottinger, A.: Z. Vitaminforsch. **1941**. 310. — [20] Huet, G. J.: Nederl. Tijdschr. Geneesk. **1944**, 1/9, 193. — [21] Jackson, R.W.: J. of Biol. Chem. **1932**, 98. — [22] Joller, H. J.: Untersuchungen über die Beeinflussung experimenteller Infektionen bei Laboratoriumstieren durch Vitamin E. Diss. Zürich 1946. — [23] Lafontaine, A.: Sang **1948**, 19/2, 107. — [24] Lohel, H.: Dtsch. Gesundheitswesen **1952**, 1365. — [25] Lubich u. Ancaniera: Lotta Tbc. **17**, 188 (1947). — [26] Mason, K. E., and A. F. Emmel: Anat. Rec. **92**, 33 (1945). — [27] Menschik-Szczesniak, J.: zit. Handb. inn. Med. IV/**6**, II, 739. — [28] Miller, L., J. F. Ross and Ch. Whipple: Amer. J. Med. Sci. **200**, 739 (1940). — [29] Natvig: zit. Literaturstudium zum Tuberkuloseproblem unter besonderer Berücksichtigung antituberkulöser Stoffe A. Lembke u. E. Krüger-Thiemer, Jena: G. Fischer 1952. — [30] Nevinni-Stickel, H.: H. Z. Geburtsh. **12**, 256 (1952). — [31] Petzold, H.: Ärztl. Forsch. **9**, 50 (1955). — [32] Pichat et Minjat: C. r. Soc. Biol. (Paris) **143**, 508 (1949). — [33] Piller, S.: Beitr. Klin. Tbk. **105**, 61 (1951). — [34] Prosser, M., u. H. Vosicki: Hautarzt **1950**, 121. — [35] Raab, W.: ref. Excerpt. a. med. (Amsterdam) Sect. XV, Vol. I/9 (1948). — [36] Schwarz, K.: Z. physiol. Chem. **1944**, 109. — [37] Steinbach, M.,and S. J. Klein: Amer. Rev. Tbc. **43**, 403 (1941). — [38] Stiller, G., u. H. P. Wachter: Acta Hepatolog. **1953**, 1. — [29] Trautwein, H., u. E. Stein: Beitr. Klin. Tbk. **107**, 295 (1952). — [40] Trautwein, H., u. E. Stein: Übersichtsreferat in E. Mercks Jahresbericht 1949/429. — [41] Trautwein, H., u. E. Stein: Übersichtsreferat in E. Mercks Jahresbericht 1950/376. — [42] Urabe, K., u. S. Yuge: Kekkaku (Tubesculosio) **25**, 1 (1900); ref. Zbl. Tbk.forschg **1951**, 413. — [43] Wagner, W. H., u. H. D. Vogelsang: Klin. Wschr. **1947**, 237. — [44] Weissberger, L. H., and B. H. Harris: J. of Biol. Chem. **151**, 543 (1943).

Dr. H. zur Horst-Meyer, II. Med. Klinik d. Martin-Luther-Univ., Halle-Wittenberg

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 71—92 (1955)

Aus dem Pharmakologischen Laboratorium der Knoll A.-G., Ludwigshafen/Rhein
(Leiter: Prof. Dr. H. Haas)

Octinum, Hydro-Octinum, Octinum D. Ein Beitrag zur Analyse des Wirkungsmechanismus

Von
H. Haas

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 30. Juni 1955)

Unsere Kenntnisse über den Wirkungsmechanismus des Octinum (2-Methylamino-6-methylhepten) sowie des chemisch verwandten Hydro-Octinum (2-Methylamino-6-methylheptan) und des Octinum D (2-Isoamylamino-6-methylheptan) reichen nicht aus, um zu entscheiden, ob diese Gruppe von Substanzen gleichartige Angriffspunkte und einen gleichsinnigen Wirkungsmechanismus besitzt. Selbst die Angaben über die Wirkstärken schwanken außerordentlich. Dies gilt vor allem für die Beeinflussung des Kreislaufes durch Octinum, für das in dieser Hinsicht, abgesehen von einem Abfall des Blutdruckes nach hohen Gaben, wenig übereinstimmende Beobachtungsresultate vorliegen.

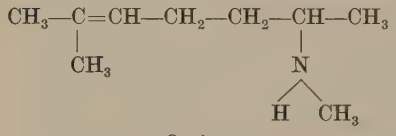
Mügge sowie Fliegenbaum geben an, daß es an Kaninchen und Katzen im niedrigen Dosierungsbereich keine Veränderungen des Blutdruckniveaus auslöst. Andererseits sahen Baltaceanu u. Mitarb. am Hund schon nach der Anwendung kleiner Dosen eine deutliche Blutdrucksenkung, die mit Erhöhung der Dosis an Intensität zunahm. Die meisten Untersucher konnten bei Hund und Katze in der Regel einen Blutdruckanstieg feststellen, dem meist ein kurzdauernder und geringgradiger blutdrucksenkender Effekt voranging (Issekutz, Ahlquist, Muñoz, Régniers, Samaan u. Saad, Gruber, Walton, Jackson). Ähnliche uneinheitliche Ergebnisse liegen für Octinum D vor. Nach Girndt führt es an Kaninchen manchmal zu einer Blutdrucksteigerung. Savini konnte dagegen an Hund, Katze und Kaninchen nur blutdruckmindernde Wirkungen erzielen. Vom Hydro-Octinum sind lediglich blutdrucksteigernde Effekte bekannt (Biehler).

Nach den Angaben von Mügge wird das Wirkungsbild des Octinum von seinem erschlaffenden Einfluß auf die Organe mit glatter Muskulatur beherrscht; erst beim Einsatz größerer Gaben ist eine Erregung des Sympathicus nachweisbar. Auch Scholten bezeichnet das Octinum als ein Mittel vom Papaverin-Typ, dem als Besonderheit zusätzlich sympathicotone Eigenschaften zukommen. Nach Jackson ist dagegen Octinum ein rein sympathicomimetisches Amin, welches diejenigen glatten Muskeln erschlafft, bei denen sich die Sympathicuserregung hemmend auswirkt. An den übrigen Erfolgsorganen, an denen der Sympathicus

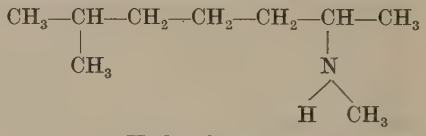
eine Förderung der Funktion verursacht, tritt kein tonusherabsetzender Effekt auf; so erweitert es die Pupillen und setzt durch eine Gefäßkonstriktion einen starken Anstieg des arteriellen Blutdruckes. Auch Issekutz u. Biehler betonen, daß die sympathicotropen Eigenschaften im Wirkungsbild des Octinum überwiegen und daß lediglich das Untersuchungsobjekt entscheidet, ob der sympathicusreizende Effekt genügend zur Geltung kommt. Daneben soll jedoch das Octinum eine direkte Wirkung auf die glatte Muskulatur entfalten und ähnlich wie Papaverin die Darmfunktion lähmen.

Bei Octinum D sind nach der Ansicht von Scholten die sympathicotonen Effekte derart abgeschwächt, daß sie praktisch nicht mehr in Erscheinung treten. Girndt sieht wiederum in der Beeinflussung des Sympathicus einen Teilfaktor, der zur Hemmung der Darmtätigkeit beiträgt. Hydro-Octinum ist nach den Untersuchungsergebnissen von Biehler gleich stark wie Octinum wirksam und stimmt in seinem Wirkungsmechanismus mit diesem überein.

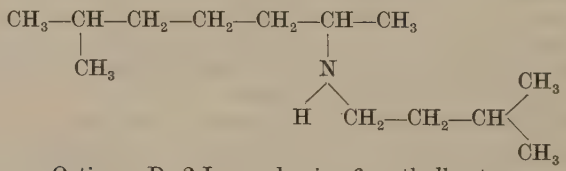
Eine weitere Wirkung des Octinum besteht nach Freund in der Verstärkung eines zentral-analgetischen Effektes beim Zusatz zu schmerzstillenden Arzneigemischen. Eine Entscheidung über das Ausmaß dieser analgetischen Komponente, die im Tierversuch nicht regelmäßig nachweisbar war, ließ sich jedoch nicht fällen. Das gleiche gilt für Hydro-Octinum, wenn man auch bei der Erprobung am Menschen den Eindruck gewann, daß es etwa gleichstark wie Octinum in der Kombination mit schmerzlindernden Substanzen wirkt (Biehler). Inwieweit diese



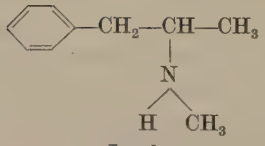
Octinum:
2-Methylamino-6-methylhepten



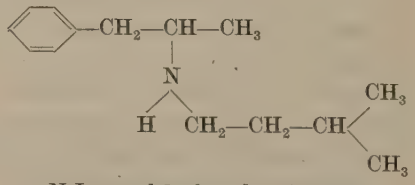
Hydro-Octinum:
2-Methylamino-6-methylhepten



Octinum D: 2-Isoamylamino-6-methylheptan



Isophen:
N-Methyl-1-phenyl-aminopropan



N-Isoamyl-1-phenyl-aminopropan

Ergebnisse auf Octinum D übertragbar sind, ist nicht bekannt. Ebensowenig liegen Beobachtungsresultate vor, ob beispielsweise durch eine Kombination von Octinum und Octinum D in irgendeiner Richtung eine Steigerung der Wirkungsintensität zu erzielen ist.

Zur Klärung dieser Fragen wurde eine Reihe von Versuchen durchgeführt, bei denen, teilweise im Vergleich zu den aliphatischen Aminen Octinum, Hydro-Octinum und Octinum D, zwei aromatische Alkylamine geprüft wurden, die am Stickstoff mit den gleichen Radikalen, einer Methyl- bzw. Isoamyl-Gruppe, substituiert sind.

Versuchsergebnisse

Beeinflussung des Blutdruckes

Zur Narkose wurden beim Hund Morphin 6,0 mg/kg s. c. und Pernocton 40,0 mg/kg s. c., bei der Katze Chloralose 70,0 mg/kg s. c. verwendet. Die Zufuhr der Prüfsubstanzen erfolgte über die Vena femoralis. Der Blutdruck wurde mit Hg-Manometer registriert.

In beiden Versuchsreihen bewirkten Octinum und Hydro-Octinum in einem Dosierungsbereich von 0,5—4,0 mg/kg regelmäßig einen Anstieg des Blutdruckes, dessen Intensität mit der Steigerung der Dosis zunimmt und dem in der Regel ein kurzdauernder und geringgradiger Blutdruckabfall vorausgeht. Bei der Anwendung von 1 mg/kg Octinum schwankt das Ausmaß der Blutdrucksteigerung zwischen 50—80 mm Hg; ihre Dauer beträgt durchschnittlich 7—12 min. Die primäre Blutdrucksenkung bewegt sich zwischen 10—20 mm Hg. Unter 12 Einzelversuchen an der Katze blieb sie fünfmal aus. Im allgemeinen fällt der blutdrucksteigernde Effekt des Octinum im Vergleich zu äquimolaren Dosen von Hydro-Octinum etwas stärker und dementsprechend länger anhaltend aus, während das vergleichsweise geprüfte Isophen sich bei gleichartiger Dosierung in seiner Wirkungsintensität und Wirkungsdauer fast wie Octinum verhält.

Nach Papaverin in Dosen von 1—2 mg/kg intravenös bleibt die Blutdruckreaktion des Octinum unbeeinflußt. Gibt man zuvor 1—2 mg/kg Atropin intravenös, so fehlt der primäre kurzdauernde Blutdruckabfall, der ansteigende Gipfel bleibt dagegen unverändert erhalten. Das gleiche gilt für Hydro-Octinum.

In Übereinstimmung mit Befunden von Issekutz bewirkt Yohimbin in Gaben von 1—1,5 mg, die eine Umkehr der Adrenalin-Reaktion herbeiführen, eine Abschwächung bzw. Umkehr des pressorischen Effektes von Octinum und Hydro-Octinum. Eine Cocaindosis von 2—3 mg/kg verhindert den Blutdruckanstieg von Octinum und Hydro-Octinum völlig, so daß lediglich eine kurzdauernde Blutdrucksenkung übrigbleibt, während gleichzeitig für Adrenalin eine deutliche Steigerung seiner Blutdruckwirksamkeit nachweisbar ist. Damit verhalten sich Octinum und

Hydro-Octinum wie 1-Phenylaminoäthan, 1-(4-Oxyphenyl)-aminoäthan (Tyramin) und N-Methyl-1-phenylaminopropanol (Ephedrin), die gleichfalls durch Cocain in ihrer Blutdruckwirkung gehemmt werden (Tainter, Raymond-Hamet, Pak, de Edds, Burn).

Gleichzeitig mit der Blutdruckmessung wurde am Hund die Darmtätigkeit mittels eines per os in das Duodenum eingeführten Ballons registiert. Octinum und Hydro-Octinum verursachen innerhalb des geprüften Dosierungsbereiches eine leichte und kurzdauernde Abnahme des Tonus und eine geringgradige Einschränkung der peristaltischen Bewegungen. Dieser Effekt entfällt wie die blutdrucksteigernde Wirkung unter der Einwirkung von Yohimbin und Cocain.

Ähnlich wie nach Cocain und Yohimbin bleibt der blutdrucksteigernde Effekt des Octinum an Hund und Katze nach einer Vorbehandlung der Tiere mit Ephedrin bzw. Isophen in einer Dosierung von 0,1—0,2 mg/kg aus. Auch Issekutz und Ahlquist konnten mit Ephedrin eine Abschwächung bzw. Auslöschung des Octinum-Effektes am Blutdruck erzielen. In dieser Hinsicht besteht wiederum eine Parallele zu anderen sympathicomimetischen Aminen, für die bekannt ist, daß sie sich in ihrem blutdrucksteigernden Effekt antagonistisch beeinflussen können.

Andererseits besitzen Octinum und Hydro-Octinum keine antagonistischen Eigenschaften gegenüber Adrenalin bzw. Ephedrin.

Pendiomid[1] und Hexamethonium in Dosen von 1—2 mg/kg i. v. verstärken die pressorische Wirksamkeit von Octinum und Hydro-Octinum, wobei die Wirkungsdauer erheblich verlängert wird. Größere Dosen der ganglienblockierenden Stoffe lassen diese Zunahme des blutdrucksteigernden Effektes verschwinden.

Bekanntlich wird auch die Wirksamkeit von Adrenalin und Nor-Adrenalin durch Pendiomid und Tetraäthylammoniumbromid gesteigert (Bein, Page). Die Ursache dieses Wirkungsanstieges ist noch unklar. Man geht aber wohl nicht fehl, wenn man annimmt, daß durch die ganglienblockierenden Substanzen gewisse gegenregulatorische Funktionen ausgeschaltet werden, die den Effekt des Octinum bzw. Hydro-Octinum oder der durch diese Stoffe freigesetzten Überträgersubstanzen begünstigen können. Diese Zunahme der pressorischen Aktivität von Octinum macht sich auch bemerkbar, wenn zunächst durch Ephedrin der Blutdruckanstieg des Octinum abgeschwächt wurde. Andererseits läßt sich ein durch Pendiomid verstärkter Octinum-Effekt durch eine nachfolgende Ephedrin-Gabe wieder abschwächen.

An der decapitierten Katze zeigen Octinum und Hydro-Octinum ein gleichsinniges Verhalten. Dies gilt für die blutdrucksteigernden Grenzschwellengaben, für die Abhängigkeit der Wirkstärke von der gewählten Dosierung sowie für die Wechselwirkung mit anderen Pharmaka.

Im Gegensatz zu Octinum und Hydro-Octinum verursacht Octinum D in Dosen von 0,5—4,0 mg i. v. an Hund und Katze ebenso wie N-Isoamyl-1-phenylaminopropan stets einen Abfall des Blutdruckes, der auch bei höherer Dosierung von kurzer Dauer bleibt und in der Regel

[1] E. W. Z. Ciba A.G.

nicht von einer Blutdrucksteigerung gefolgt ist. Von 21 Beobachtungen an der Katze wurde fünfmal ein kurzfristiger Blutdruckanstieg durch die Zufuhr von 1 mg/kg i. v. bewirkt, der maximal 10—15 mm Hg betrug. Die Substitution des Stickstoffes mit einer Isoamylgruppe bedingt also eine Umstellung der Kreislaufwirkung.

Von der Reihe der Phenylalkylamine ist bekannt, daß mit der zunehmenden Zahl der C-Atome und der Verlängerung der Alkyl-Seitenkette am Amino-N die pressorische Wirkung in eine depressorische umschlagen kann. Dies gilt insbesonders, wenn die N-Alkylsubstituenten mehr als 2 Kohlenstoffatome enthalten. Besonders günstige Voraussetzungen bietet die Einfügung einer Propyl-, Butyl- bzw. Isopropyl- oder Isobutyl-Gruppe, durch die bei einer ganzen Reihe von Phenylalkylamin-Derivaten die pressorische Komponente ausgelöscht wird und in allen Dosierungsbereichen nur eine Blutdrucksenkung übrigbleibt. So fanden Chen u. Mitarb. an Ephedrin-Derivaten, die am Amino-N mit einer Methyl-, Äthyl-, Propyl- oder Butyl-Gruppe substituiert waren, daß mit zunehmender Zahl der C-Atome beim Propyl-Ephedrin die pressorische Wirkung einer Blutdrucksenkung Platz macht. Ebenso weichen die N-Propyl-, N-Isopropyl-, N-Butyl- und N-Isobutyl-Homologe des Arterenol deutlich von der Wirkungsweise des Arterenol bzw. Adrenalin ab, indem sie statt blutdrucksteigernd blutdrucksenkend wirken (Konzett, Lands, Marsh, Gaddum). Ähnliche Effekte sind für eine Reihe weiterer Phenylalkylamine beschrieben, soweit sie am Aminostickstoff gleichartige Substituenten tragen. Im einzelnen gilt dies für die entsprechenden Abwandlungsprodukte des 1-Phenylaminoäthan (Lands), des 1-Phenylaminoäthanol (Lands), des 1-(4-Oxyphenyl)-aminoäthanol (Lands), des 1-(3-Oxyphenyl)-aminoäthanol (Lands), des 1-(4-Oxyphenyl)-aminopropanol (Lands), des 1-(3,4-Dioxyphenyl)-aminoäthan (Lands), des 1-(3,4-Dioxyphenyl)-aminoäthanol (Marsh, Lands) und des 1-(3,4-Dioxyphenyl)-aminobutanol (Lands). Phenylalkylamine, die am Aminostickstoff eine Isoamyl-Gruppe tragen, sind bisher nicht untersucht worden. Lands u. Tainter beschreiben lediglich für das N-3-Amyl-Arterenol eine depressorische Wirkung.

Der Abfall des Blutdruckes, den Octinum D und N-Isoamyl-1-phenyl-aminopropan verursachen, wird durch Papaverin nicht beeinflußt. Ebensowenig wird er durch eine Vorbehandlung mit Antihistaminen (Soventol 1—3 mg/kg i. v.) verhindert. Er kann also nicht histaminartig sein. Ein sympathicolytischer Mechanismus ist ebenfalls auszuschließen, da die Adrenalin-Reaktion nach der Zufuhr von Octinum D völlig erhalten bleibt. Arterenol wird sogar in seinem Blutdruckgipfel etwas gesteigert. Auch Cocain und Yohimbin lassen in Gaben, die den Adrenalin-Effekt verstärken bzw. aufheben, die Blutdrucksenkung des Octinum D unverändert. Die Blutdrucksteigerung durch Octinum D fällt allerdings bei dieser Vorbehandlung regelmäßig fort. Auch Savini beobachtete, daß Yohimbin-Gaben, die zu einer Umkehr der Adrenalin-Wirkung führen, beim Hund die Blutdruckwirksamkeit des Octinum D nicht verändern.

Atropin scheint dagegen den pressorischen Effekt des Octinum D eher zu begünstigen, ohne sich jedoch in dieser Richtung gleichmäßig auszuwirken. Zum Teil bleibt die Blutdrucksenkung des Octinum D erhalten, manchmal fehlt sie gänzlich oder tritt nur in abgeschwächter Form auf. In etwa 50% der Fälle kommt es jedoch nach der Atropin-Vorbehandlung

zu einem Blutdruckanstieg von 20—30 mm Hg, der sich an eine vorangehende Senkung anschließt oder sogar als einzige Reaktion in Erscheinung tritt. In jedem Falle ist diese Blutdrucksteigerung durch Yohimbin wieder auszulöschen. Savini hatte bereits nach Atropin einen Anstieg des arteriellen Druckes unter Zugabe von Octinum D beobachten können. Man kann also für Octinum D unter gewissen Versuchsbedingungen latente konstriktorische Wirkungen aufdecken.

Deutliche blutdrucksteigernde Effekte erhält man mit Octinum D regelmäßig nach einer Vorbehandlung der Tiere mit Ephedrin (0,1 bis 0,2 mg/kg i. v.), von Octinum sowie Pendiomid und Hexamethonium (1—2 mg/kg), wobei auch dieser Blutdruckanstieg durch Yohimbin beseitigt werden kann.

Spartein in Gaben von 20—30 mg/kg i. v., fraktioniert verabreicht, läßt den pressorischen Einfluß des Octinum D trotz einer völligen Aufhebung der Nicotin-Reaktion unverändert bestehen. Erst eine nachfolgende Yohimbin-Gabe bewirkt, daß dieser Effekt des Octinum D verschwindet. Man darf also annehmen, daß die durch Octinum D verursachte Blutdrucksteigerung über eine Erregung der peripheren sympathischen Endapparate zustande kommt und nicht auf einer Ausschüttung von Adrenalin aus den Nebennieren beruht.

An der decapitierten Katze wirkt Octinum D fast regelmäßig blutdrucksteigernd. Nur vereinzelt ist ein kurzer vorangehender Abfall zu beobachten. In 2 von insgesamt 12 Versuchen trat lediglich eine geringe Senkung ohne jede Blutdrucksteigerung ein. Nach einer vorherigen Octinum- bzw. Ephedrin-Behandlung ist Octinum D ausschließlich pressorisch wirksam. Pendiomid verstärkt seinen Blutdruckanstieg deutlich, Yohimbin löscht ihn dagegen aus. Das gleiche gilt für Cocain. Gibt man an der decapitierten Katze Spartein in Dosen, die zu einer Aufhebung der Nicotin-Reaktion führen, so bleibt der Octinum D-Blutdruckanstieg ebenso wie der des Adrenalin unverändert erhalten. Erst Yohimbin vermag unter diesen Bedingungen den Octinum D-Effekt zu beseitigen. Die latenten konstriktorischen Wirkungen des Octinum D treten demnach immer wieder in Erscheinung, wenn die gegenregulatorischen Möglichkeiten irgendwie eingeschränkt sind.

Wirkung auf die Nickhaut der Katze

Octinum und Hydro-Octinum in Dosen ab 1 mg/kg lösen eine langanhaltende Nickhautkontraktur aus, die in ihrer Dauer den Blutdruckanstieg weitaus übertrifft. Wie die Blutdruckreaktion wird auch die Kontraktur der Nickhaut durch eine Vorbehandlung mit Yohimbin oder Cocain abgeschwächt bzw. unterdrückt.

Auch die aromatischen Phenylalkylamine: Tyramin, Phenylaminoäthan, Amphetamin, Isophen und Veritol sowie Cyclohexylaminopropan und Phenylmethyl-

morpholin verlieren nach der Cocainisierung ihren Nickhauteffekt weitgehend (Fleckenstein). Ebenso sinkt die Wirkung dieser Substanzen auf die Nickhaut bei einer Degeneration der postganglionären sympathischen Fasern erheblich ab (Lockett, Fleckenstein, Fleckenstein u. Burn).

Bei Octinum tritt gleichfalls 3—5 Tage nach der operativen einseitigen Entfernung des Ganglion cervicale superius eine Abschwächung der Nickhautkontraktur ein, die sich von dem Verhalten der normalen Seite deutlich unterscheidet. Denervierung und Cocainisierung wirken sich bei Octinum somit gleichsinnig aus. Es besteht allerdings bei Octinum keine so gute Übereinstimmung zwischen der Reaktion der denervierten und cocainisierten Nickhaut, wie sie Fleckenstein für die meisten Phenylalkylamine gefunden hat.

Octinum D sowie N-Isoamyl-1-phenylaminopropan lassen die Nickhaut am unbehandelten Tier völlig unbeeinflußt. Dieses Verhalten entspricht den Befunden von Konzett mit Propyl-, Isopropyl-, Butyl- und Isobutyl-Arterenol, die ebenfalls in hohen Dosen keinen Einfluß zeigten. Nach Vorbehandlung mit Octinum sowie Ephedrin in Dosen von 1 bzw. 0,1 mg/kg bewirkt Octinum D in Gaben von 5 mg/kg eine starke Kontraktur, die durch Cocain und Yohimbin abzuschwächen oder zu unterdrücken ist. An der denervierten Nickhaut wurde mit Octinum D keine Wirkung erzielt.

Uteruswirkung

Die Uteruswirkung wurde an Kaninchen in Anlehnung an die von Kraushaar beschriebene Technik in situ getestet unter gleichzeitiger Registrierung des Blutdruckes sowie der Darm- und Atemtätigkeit.

Octinum, Hydro-Octinum, Octinum D sowie N-Isoamyl-1-phenylaminopropan bewirken in Dosen von 1—2 mg eine kurzfristige Blutdrucksenkung und Uteruserregung. Die Darmtätigkeit wird abgeschwächt. Die Atemfunktion bleibt in dem geprüften Dosierungsbereich, abgesehen von einer geringgradigen, meist nur angedeuteten Vertiefung des Atemvolumens unbeeinflußt. Der uteruserregende Effekt ist bei Octinum und Hydro-Octinum durch Cocain und Yohimbin weitgehend zu beseitigen. Octinum D und N-Isoamyl-1-phenylaminopropan erweisen sich dagegen in ihrer Uteruswirksamkeit gegen eine Vorbehandlung mit Cocain fast in allen Versuchen als unempfindlich, während Yohimbin wiederum abschwächend wirkt.

Darmwirkung

Die Versuche am Darm beschränken sich auf eine vergleichende Auswertung von Octinum und Octinum D unter gleichzeitiger Berücksichtigung des Verhaltens beider Substanzen bei kombinierter Darreichung.

Die quantitative Auswertung erfolgte am spastisch veränderten Organ, und zwar in vitro am isolierten Meerschweinchendarm nach der Methode von Magnus

sowie in vivo am Meerschweinchen in der Versuchsanordnung nach Straub. Zur Krampfauslösung dienten am isolierten Darm Doryl (0,1 mg/Liter) und Bariumchlorid (100 mg/Liter). Am Ganztier wurde nach den Angaben von Brock ein Spasmus durch eine fortlaufende Durchströmung des Bauchraumes mit Bariumchlorid (300 mg/Liter) erzeugt. Der spasmolytische Effekt wurde als positiv bewertet, wenn nach dem Zusatz von Octinum bzw. Octinum D der Krampfabfall 75% oder mehr betrug. Für jede Dosis bzw. Konzentration wurde ein Kollektiv von 5—7 Darmstücken benutzt. Die Ergebnisse sind in Prozent positiv reagierende Darmstücke in die Tab. 1 u. 2 eingesetzt.

Tabelle 1. *Auswertung am isolierten Me-Dünndarm in vitro (nach* Magnus*): Reihenversuche an 5—7 Darmstücken/Konzentration*

Octinum, Octinum D mg/Liter	Doryl 0,1 mg/Liter Prozent d. Darmstücke mit Spasmolyse von 75% oder mehr	Octinum, Octinum D mg/Liter	Bariumchlorid 100 mg/Liter Prozent d. Darmstücke mit Spasmolyse von 75% oder mehr
10,0	20	40,0	0
14,0	60	50,0	20
20,0	100	55,0	40
		60,0	70
2,5	20	14,0	0
5,0	50	20,0	20
10,0	85	30,0	50
		40,0	80
3,5 + 1,2	10	17,0 + 6,5	0
4,5 + 1,5	40	18,0 + 7,0	30
5,5 + 1,8	60	20,0 + 8,0	50
6,5 + 2,2	100	25,0 + 10,0	100
2,5 + 2,5	20	10,0 + 10,0	20
3,0 + 3,0	60	14,0 + 14,0	60
3,3 + 3,3	100	20,0 + 20,0	100

Zwischen Octinum und Octinum D bestehen deutliche Unterschiede in quantitativer Hinsicht, da Octinum D den durch Doryl erregten Meerschweinchendarm wie auch die durch Bariumchlorid erzeugte Kontraktur noch in kleineren Dosen als Octinum zu beeinflussen vermag. Durchschnittlich werden von Octinum am Ganztier und am isolierten Darm 2—3fach höhere Mengen als von Octinum D benötigt, um bei 50% der Darmstücke den geforderten spasmolytischen Effekt von 75% oder mehr zu erzielen.

Das von Gerndt ermittelte Wirkungsverhältnis, demzufolge Octinum D gegenüber Bariumchlorid 10fach und gegenüber Acetylcholin 10—30fach besser wirken soll, konnten wir nicht bestätigen. Dagegen fand schon von Brücke bei dem Vergleich von Octinum und Octinum D Wirkungsunterschiede, die den eigenen Befunden weitgehend entsprechen. Bei dem durch Vagotomie erzeugten Cardiospasmus lag die krampflösende Schwellendosis bei intravenöser Zufuhr für Octinum D bei 5,5 mg/kg und für Octinum bei 15 mg/kg. Ebenso benötigte Biehler für die Ruhigstellung des normal arbeitenden Meerschweinchendarmes und für die Lyse

des durch Bariumchlorid erregten Darmes in situ von Octinum die 3fach höhere Dosis als von Octinum D.

Die Dosis-Wirkungsgeraden lassen bei ihrer Auswertung nach Lichtfield u. Wilcoxon, abgesehen von quantitativen Abweichungen, keine statistisch signifikante Differenz in ihrem Verlauf und Neigungswinkel erkennen, so daß man auf einen gleichartigen Mechanismus beider

Tabelle 2. *Auswertung am Me-Dünndarm des Ganztieres in situ (nach* Straub*): Reihenversuche an 5—7 Tieren/Einzeldosis*

Octinum mg/kg	Octinum D mg/kg	Bariumchlorid i. p. 300 mg/Liter Prozent der Tiere mit Spasmolyse von 75% oder mehr
10,0		33
15,0		50
	2,5	0
	5,0	55
	7,5	80
	10,0	100
2,0 +	2,0	0
3,0 +	3,0	33
4,0 +	4,0	66
5,0 +	5,0	100
6,0 +	2,5	0
7,5 +	2,5	60
10,0 +	2,5	75

Substanzen schließen darf. Dem ist aber entgegenzuhalten, daß Yohimbin am Meerschweinchen in einer Dosis von 1 mg/kg bzw. Dibenamin in einer Dosis von 15 mg/kg bei i. v. Darreichung den spasmolytischen Effekt von Octinum, 15 mg/kg, völlig unterdrücken, während die Wirkung von Octinum D, 7,5 mg/kg, auch nach dieser Vorbehandlung unverändert erhalten bleibt. Es lassen sich somit am Darm unter diesen Voraussetzungen Unterschiede im Wirkungsbild aufzeigen. Dieser Eindruck eines nicht völlig gleichgearteten Wirkungsmechanismus verstärkt sich noch, wenn man die bei der Kombination von Octinum und Octinum D erzielten Ergebnisse berücksichtigt, aus denen hervorgeht, daß die Mengen von Octinum bzw. Octinum D, die für den gewünschten spasmolytischen Effekt erforderlich sind, durch die Wahl eines geeigneten Mischungsverhältnisses beider Substanzen weitgehend reduzierbar sind. Auf diese Weise kann man erreichen, daß die Hälfte der 100%igen Wirkdosis von Octinum D, die bei alleinigem Einsatz nur bei 55% der Tiere den Spasmus in der geforderten Größenordnung löst, durch eine kleine Zusatzdosis des weitaus schwächer wirksamen Octinum einen vollwertigen Spasmolyseeffekt erzielt. Diese Steigerung der Wirkungsintensität für Octinum D geht sogar über einen additiven Effekt hinaus,

da die benötigten Zusatzmengen von Octinum, allein gegeben, absolut unwirksam sind. Dies erscheint eigentlich nur verständlich, wenn zwischen Octinum und Octinum D im Wirkungscharakter gewisse Differenzen bestehen. Wählt man die kleinere Dosis Octinum D von 2,5 mg, die ohne Zusatz von Octinum bei keinem der benutzten Darmstücke einen Krampfabfall von 75% bewirkt, so muß man die Zugabe von Octinum bis auf 10 mg/kg steigern, um mit dieser geringen Octinum D-Gabe eine gute Wirkungsintensität zu erreichen. Selbst unter diesen Bedingungen benötigt man in der Mischung nicht eine Gesamtdosis, die einer gleich stark wirksamen Gabe von Octinum D entspricht, wenn man in diese Rechnung einsetzt, daß Octinum etwa 3mal schwächer spasmolytisch als Octinum D wirkt. Man kann also das Octinum D durch das weniger wirksame Octinum so weit verstärken, daß ein überadditiver Effekt zustande kommt. Wenn man nicht einen ungleichartigen Wirkungsmechanismus annehmen will, der auf Grund des Verlaufes der Wirkungsgeraden unwahrscheinlich ist, so muß sich ein weiterer Faktor (siehe Besprechung der Ergebnisse) in dieser Mischung auswirken, der für eine derartige Wirkungszunahme verantwortlich ist[1]. Zur Verdeutlichung der erzielten Ergebnisse sind diese, jeweils berechnet auf die 50%igen Wirkdosen, nochmals in der Tab. 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3. *Vergleich der am isolierten Me-Darm erhaltenen mittleren Grenzkonzentrationen (ED 50) mit den 50%igen Wirkdosen am Ganztier*

Alternativpaar		Me-Dünndarm in vitro ED 50 mg/Liter	Me-Dünndarm in situ (Ganztier) ED 50 mg/kg
Octinum	Doryl	12,8	
Octinum D	Doryl	4,8	
Octinum/Octinum D	Doryl	4,8 + 1,6	
Octinum/Octinum D	Doryl	2,8 + 2,8	
Octinum	Bariumchlorid	56,0	15,0
Octinum D	Bariumchlorid	28,5	4,9
Octinum/Octinum D	Bariumchlorid	20,0 + 8,0	
Octinum/Octinum D	Bariumchlorid	13,0 + 13,0	3,5 + 3,5
Octinum/Octinum D	Bariumchlorid		7,25 + 2,5

ED 50 = 50% der Fälle mit Spasmolyse von 75% oder mehr Krampfabfall.

Wirkung auf das nervenfreie Hühneramnion

Zur Klärung der Frage, ob Octinum bzw. Octinum D direkte Einflußmöglichkeiten auf die glatte Muskulatur zukommen, bietet das Hühneramnion besonders günstige Versuchsbedingungen, da die histologischen Untersuchungen immer wieder das Fehlen nervaler Elemente in den Vogelamnien ergeben haben (Verzàr, Péterfi, Stoehr, Bautzmann).

[1] Neo-Octinum E. W. Z., Knoll A.-G., enthält 0,06 g Octinum-Amidosulfonat + 0,08 g Octinum D-Amidosulfonat.

Unter Einhaltung der von ENGELHARDT sowie LENDLE beschriebenen Versuchsanordnung zeigen Octinum und Octinum D am Hühneramnion lediglich erregende Wirkungen, die bei Octinum bis zu Verdünnungen von 1:1 Million sicher nachweisbar sind und die sich bei Octinum D in Konzentrationen bis zu 1:300000 deutlich und bis zu einer Verdünnung von 1:1 Million in geringem Grade bemerkbar machen. Diese Kontraktur der Amnionmuskulatur ist durch Yohimbin nicht unterdrückbar. Der durch Bariumchlorid 1:100000 und durch Histamin 1:1 Million ausgelöste Krampf der Muskulatur läßt sich durch Octinum und Octinum D an diesem nervenfreien Objekt nicht beeinflussen.

Broncholytische Wirkung

Ähnlich wie in den Darmversuchen verhalten sich Octinum und Octinum D bei der Prüfung ihrer broncholytischen Eigenschaften an der narkotisierten Katze (Chloralose 70 mg/kg s. c.) unter Verwendung der Methode von KONZETT. Zur Auslösung des Bronchospasmus wurde Pilocarpin in einer Dosis von 3 mg/kg i. v. benutzt.

Unter diesen Versuchsbedingungen erzielen Octinum bzw. Octinum D eine 50%ige Lyse, jeweils in einer Dosis von 3 mg/kg. Kombiniert man Octinum und Octinum D, so erreicht man einen gleichartigen Effekt, wenn von jeder Substanz 1,5 mg/kg gemischt verabreicht werden. Ebenso wie am Meerschweinchendarm kann man die Wirkung des Octinum auf den Bronchospasmus durch eine Vorbehandlung mit Yohimbin in einer Dosis von 1—2 mg/kg bzw. durch Dibenamin in einer Dosis von 15 mg/kg unterdrücken, während die Octinum D-Reaktion unbeeinflußt bleibt. Es ergeben sich somit wiederum Unterschiede im Verhalten von Octinum und Octinum D, wie sie bereits in den Blutdruckversuchen und in den Versuchen am isolierten Darm nachgewiesen wurden.

Analgetische Wirkung

Die am Menschen von FREUND für Octinum bzw. von BIEHLER für Hydro-Octinum angegebenen schmerzlindernden Eigenschaften ließen sich bisher im Tierversuch mit Sicherheit nicht bestätigen. Zur Nachprüfung wurde eine Versuchsanordnung benutzt, die sich uns bereits bei der Auswertung von Morphin bzw. Substanzen der Morphin-Reihe sowie bei der Bearbeitung von Aminophenazon und Aminophenazon-Kombinationspräparaten bewährt hat (HAAS).

Als Test für die Provokation der Schmerzempfindung dienten Wärme- bzw. elektrische Reize. Für jede Dosis wurden 10 oder 20 Tiere benutzt und der Anteil an Tieren bestimmt, der 15 bzw. 30 min nach der s. c. Zufuhr der einzelnen Präparate den Wärmereiz doppelt so lange ohne Reaktion aushält bzw. die doppelte Stromstärke erträgt, ohne mit einer Schmerzäußerung in Form eines reizsynchron erfolgenden Piepstons zu antworten. Man erhält auf diese Weise für den gewählten Zeitpunkt

und für jede Dosis einen bestimmten Prozentsatz an reagierenden bzw. unempfindlichen Tieren, der unter Benutzung der von Lichtfield eingeführten mathematischen Methoden für die Berechnung der ED 50 verwertet werden kann. Gleichzeitig ist bei diesem Vorgehen aus dem Verlauf der Kurven für jede Substanz eine Aussage über ihren Wirkungsmechanismus und das Verhältnis ihrer Wirkstärke im Vergleich zu den anderen geprüften Stoffen zu gewinnen (Kraushaar). In den Tab. 4 u. 5 sind die Versuchsergebnisse als Mittelwerte aus den Bestimmungen nach 15 und 30 min, getrennt für Wärmereiz und elektrischen Reiz, eingesetzt. Die Zahlenangaben in der Tabelle besagen, wieviel Prozent der benutzten Tiere unter der Einwirkung der Prüfsubstanzen gegen Wärme- bzw. elektrischen Reiz unempfindlich sind.

Tabelle 4. *Versuche an der Maus, 10—20 Tiere pro Dosis*

Dosis mg/kg s. c.	Octinum	Hydro-Octinum	Octinum D
	% Analgesie. Wärmereiz.		
3,5	20		
5,0	30		
10,0	50		
12,0		15	0
15,0	65	30	
20,0	75	40	0
25,0		40	
30,0		55	5
50% Analgesie	9,6	27,5	—
	% Analgesie. Elektr. Reiz.		
5,0		15	
8,0	30	35	
12,0	60	50	
15,0	70		
20,0	90	60	
30,0		95	5
50,0			30
70,0			45
50% Analgesie	10,8	13,0	> 70,0

Aus den errechneten 50%igen Wirkdosen ist zu entnehmen, daß Octinum im Wärmetest und bei der Anwendung elektrischer Reize etwa gleich stark wirkt. Bei Hydro-Octinum sind dagegen im Wärmetest etwa dreifache Dosen erforderlich, während es gegenüber elektrischen Reizen fast gleich stark wie Octinum wirkt. Für Octinum D ist eine 50%ige Wirkdosis nicht anzugeben, da es innerhalb des gesamten geprüften Dosierungsbereiches nur einen geringgradigen Einfluß zeigt.

Auch in der Kombination mit Aminophenazon erreicht man durch den Zusatz von Octinum in Dosen, die selbst nur mäßig analgetisch wirken, eine deutliche Verstärkung des Aminophenazon-Effektes. Dies gilt sowohl für den Wärmetestversuch wie für die Anwendung elektrischer Reize, bei denen jeweils kleinere Dosen von Aminophenazon

genügen, um eine sichere analgetische Wirkung zu erzielen. In dieser Hinsicht ist das Octinum dem Hydro-Octinum deutlich überlegen, selbst wenn von Hydro-Octinum wesentlich höhere Gaben zum Einsatz gelangen. Unter diesen Bedingungen vermag Hydro-Octinum allerdings gegenüber Wärmereizen den Effekt des Aminophenazon erheblich zu verstärken. Im elektrischen Test bleibt dagegen die Begünstigung der analgetischen Wirksamkeit von Aminophenazon fast völlig aus. Bei

Tabelle 5. *Versuche an der Maus. 10—20 Tiere pro Dosis*

Dosis mg/kg s. c.	Pyramidon allein	Pyramidon in Kombination mit Octinum		Hydro-Octinum		Octinum D	
		2,5	5,0	5,0	15,0	5,0	30,0
			% Analgesie. Wärmereiz.				
18,0			0	5	5		
25,0	5	20	10	20	40		
35,0		25	40	40	60	10	5
50,0	25	50	60	50	80	15	15
70,0	40	50	70	75	85	35	40
80,0			100				
100,0		70					
115,0	60						
160,0	70						
190,0	90						
50% Analgesie	92,0	62,0	47,0	45,0	32,0		
			% Analgesie. Elektr. Reiz.				
18,0			30				
25,0			40				
35,0		20	45				
50,0	15	40	55	20	35	20	10
70,0	35	60	70	45	40		
100,0	40	100		55	65	45	25
140,0	50				70		
170,0	70			90		80	
195,0	70						
220,0	90						
50% Analgesie	115,0	58,0	42,0	85,0	80,0	103,0	

Octinum D ist sogar eine Zugabe von hohen Dosen völlig unwirksam, so daß lediglich die analgetische Wirksamkeit des Aminophenazon übrigbleibt.

Der Verlauf und die Neigung der Wirkungsgrade von Aminophenazon wird durch die Zugabe von Octinum und Hydro-Octinum nicht beeinflußt. Es ist deshalb nicht anzunehmen, daß durch den Zusatz von Octinum bzw. Hydro-Octinum Änderungen im Wirkungscharakter des Aminophenazon eintreten.

Entzündungshemmende Wirkung

Dieses unterschiedliche Verhalten zwischen Octinum bzw. Hydro-Octinum und Octinum D in Kombination mit Aminophenazon bestätigt sich auch bei der Messung des entzündungshemmenden Effektes.

Die methodischen Einzelheiten für diese Versuchsreihen sind bereits in einer früheren Veröffentlichung im einzelnen beschrieben (Haas). Zur Provokation eines Entzündungs- und Schwellungszustandes wurden Eiereiweiß und Crotonöl benutzt, die jeweils am Rattenfuß in die Plantarseite injiziert wurden. Vom Eiereiweiß wurden 0,1 cm^3, vom Crotonöl 0,05 cm^3 verabreicht, wobei das Crotonöl 1:100 in Olivenöl zuvor verdünnt war. Der auftretende Schwellungszustand wurde in Millimeter mit der Schublehre dicht unterhalb des Sprunggelenkes gemessen. Die unter dem Einfluß der Prüfsubstanzen eingetretene Hemmung des Schwellungszustandes ist in den Tabellen in Prozent der Norm angegeben, nachdem bei der Crotonölanwendung an 100 unvorbehandelten Tieren die Zunahme des Fußumfanges über einen Zeitraum von 4 Std gemessen und kurvenmäßig festgelegt war, während für die Eiereiweiß-Injektion 50 Normalwerte für einen Zeitraum von 2 Std zur Verfügung standen. Die erhaltenen Ergebnisse an unbehandelten Tieren decken sich völlig mit den früheren Beobachtungen. Diese Mittelwerte wurden planimetriert. Auf diese Weise konnte die ermittelte Hemmung des Schwellungsgrades für den gesamten Zeitraum von 2 bzw. 4 Std in Prozent zur Norm berechnet werden. Für jede Einzeldosis wurden Versuchsreihen mit je 10 Tieren durchgeführt.

Tabelle 6. *Versuche am Rattenfuß. 10 Tiere pro Dosis. Hemmung des Schwellungsgrades in Prozent nach Einwirken von Eiereiweiß und Crotonöl*

Dosis mg/kg	Pyramidon allein	Pyramidon in Kombination mit Octinum		Hydro-Octinum		Octinum D	
		5,0	10,0	5,0	15,0	5,0	30,0
			Eiereiweißentzündung				
20,0	3,1	1,8	21,5	11,2	12,2	6,0	9,1
50,0	2,0	18,0	25,0	26,8	23,9	9,9	22,1
100,0	22,5	39,0	34,9	35,6	30,1	18,5	38,7
200,0	24,9						
ED 25	200,0	65,0	50,0	47,0	60,0	> 100,0	60,0
			Crotonölentzündung				
10,0			17,6				
20,0	6,5	16,1	31,7	17,9	17,7	14,2	18,6
50,0	3,0	25,1	34,9	24,8	28,5	12,0	23,5
100,0	29,2	28,2	38,3	32,9	33,0	34,4	31,9
200,0	36,5	44,7	46,3				
ED 25	92,0	50,0	15,0	50,0	40,0	77,0	60,0

Auch unter diesen Versuchsbedingungen vermag Octinum den Effekt von Aminophenazon deutlich zu steigern, so daß zur Bekämpfung der Eiereiweiß- bzw. Crotonölentzündung weitaus geringere Dosen von Aminophenazon genügen. Hydro-Octinum wirkt etwas schwächer als Octinum. Octinum D schneidet noch ungünstiger ab, selbst in relativ hohen Dosen.

Beeinflussung des Blutzuckers und der Pupillenreaktion

Für die Prüfung der Blutzuckerwirksamkeit von Octinum und Octinum D wurden Kaninchen benutzt, die 18—20 Std vorher gehungert hatten. Die Zufuhr der Prüfsubstanzen erfolgte i. v. Die Bestimmung der wahren Glucose wurde colorimetrisch nach der Methode von Frank u. Kirberger vorgenommen, und zwar jeweils vor der Injektion und 15, 30, 60, 120 bzw. 180 min nachher.

Tabelle 7

	Wahre Glucose in mg/% Kaninchen					
	Dosis i. v. mg/kg	nach 15 min	30 min	60 min	120 min	180 min
Octinum . . .	1,0	+ 14	+ 2	— 5	— 5	— 3
	2,0	— 7	— 9	— 18	— 21	— 16
Octinum D . .	1,0	— 8	— 18	— 28	— 20	— 18
	2,0	— 8	— 18	— 29	— 38	— 36
	3,0	— 21	— 21	— 18	— 20	— 16

Die Tabelle enthält Mittelwerte aus je 3 Einzelversuchen pro Dosis. Sie zeigt, daß in den geprüften Dosierungsbereichen nur geringgradige Änderungen des Blutzuckerniveaus eintreten, die meist innerhalb der normalen Schwankungsbreite liegen und im übrigen lediglich auf eine mäßige Erniedrigung der Normalwerte hinauslaufen.

Jede Veränderung am Adrenalin-Molekül führt bekanntlich zu einer Abschwächung oder Aufhebung seiner Blutzuckerwirksamkeit. Der Verlust einer der beiden Hydroxyl-Gruppen am Benzol-Ring, das Fehlen der alkoholischen OH-Gruppe am β-C-Atom der Seitenkette, die Überführung in ein primäres Amin wirken sich in dieser Weise aus. Es ist daher nicht verwunderlich, wenn die beiden aliphatischen Amine Octinum und Octinum D, die sich weitaus mehr vom Adrenalin-Molekül chemisch unterscheiden, jede blutzuckersteigernde Eigenschaft vermissen lassen.

In Versuchen am Mäuseauge ergab sich in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Brüggemann, Balcet, Mura, Jackson und Samaan, daß Octinum regelmäßig eine Erweiterung der Pupille auslöst. Diese läßt sich wiederum durch Yohimbin weitgehend unterdrücken. Brüggemann fand außerdem, daß die mydriatische Wirksamkeit des Octinum nach der Degeneration der sympathischen Nervenendigungen eingeschränkt ist. Er verlegt deshalb den Angriffspunkt in erster Linie in den Bereich der sympathischen Endapparate.

Hydro-Octinum ist in dem gleichen Dosierungsbereich nur schwach wirksam, Octinum D setzt keine Pupillenveränderung.

Die Messung der Pupillenweite erfolgte in diesen Versuchen nach der Methode von Pulewka. In der Norm fand sich ein mittlerer Pupillendurchmesser von 0,19 mm. Diese Größenordnung stimmt recht gut mit den Ermittlungen anderer Autoren überein (Bovet, Forst, Ing, Tripod). Die Versuche wurden pro Einzelgabe an 10 Mäusen durchgeführt und der Pupillendurchmesser nach 10 bzw. 15, 30, 60 und 120 min gemessen. In der Abbildung ist die erzielte Erweiterung der Pupillen, berechnet in Prozent zur Norm für Octinum, berechnet.

Toxicität

In einer letzten Versuchsreihe wurden schließlich die mittleren tödlichen Dosen für Octinum, Hydro-Octinum und Octinum D an der Maus bei i. v. und s. c. Applikation ermittelt. Die aus Reihenversuchen berechneten 50% LD bewegen sich in ähnlichen Größenordnungen wie die in der Literatur vorliegenden Angaben.

So fand Walton bei i. v. Zufuhr als mittlere tödliche Octinum-Gabe 17,5 mg und bei s. c. Zufuhr 141 mg/kg. Schulte und Mügge bestimmten die s. c. tödlichen Dosen von Octinum jeweils mit 160 mg. In den Versuchen von Fliegenbaum erwies sich Octinum etwas giftiger. Die mittlere tödliche Dosis gibt er mit 100 mg an. Ahlquist und Biehler bezeichnen 130 bzw. 135 mg als 50% LD. Für Octinum D liegt die 50% LD nach den Untersuchungen von Biehler bei 87, für Hydro-Octinum bei 115 mg/kg Maus. Ähnlich fand Savini für Octinum D 88 mg/kg ausreichend, um 50% der Tiere zu töten.

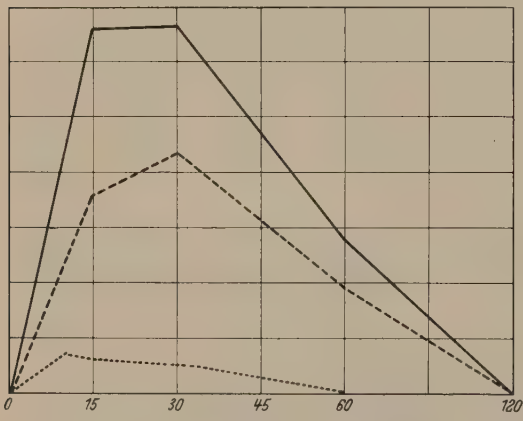


Abb. 1. —— Octinum 10 mg/kg. - - - - Octinum 10 mg/kg + 1,0 mg Yohimbin. ····· Octinum 10 mg/kg + 2,0 mg Yohimbin

Tabelle 8. *50% LD Maus*

Substanz	i. v.	s. c.
Octinum	34,0	129,0
Hydro-Octinum . .	25,0	111,0
Octinum D	16,5	88,5

Besprechung der Ergebnisse

Unter dem Eindruck der pressorischen Kreislaufwirkung des Adrenalin und Ephedrin hat man sich bei der Bearbeitung der Sympathicomimetica zunächst vorwiegend auf Strukturabwandlungen am aromatischen Kern und an der Seitenkette beschränkt. Daneben laufen jedoch seit langem zusätzliche Untersuchungen, die sich mit dem Einfluß einer Substitution an den Amino-Gruppen in homologen Reihen beschäftigen. Hierbei ergab sich die Regel, daß die pressorische Wirkung mit zunehmender Zahl der C-Atome abnimmt und gefäßerweiternde Eigenschaften zum Vorschein kommen.

Derartige Abwandlungen des Wirkungsbildes wurden gesehen bei Adrenalin-Derivaten von Konzett, Lands und Marsh, beim Ephedrin von Chen, für das 1-(4-Oxyphenyl)- bzw. 1-(3-Oxyphenyl)-aminopropan von Unna, Lands, Duesberg, Marsh und Herring sowie für eine Reihe weiterer verwandter Stoffe, über die Lands u. Tainter in jüngster Zeit zusammenfassend berichtet haben.

Auch in der Gruppe der aliphatischen Amine gibt es eine Reihe blutdruckwirksamer Substanzen, deren blutdrucksteigernder Effekt nach den Untersuchungen von Rohrmann u. Shonle besonders bei Verbindungen ausgeprägt ist, die eine Kette von 7—8 C-Atomen und eine Amino-Gruppe in 2-Stellung enthalten. So gelten beispielsweise das Dimethylhexylamin (2-Methylaminoheptan) (Jackson, Ahlquist, Roman-Vega, Heringman, Le Compte), Tuaminoheptan (2-Aminoheptan) (Proetz, Kohlstaedt, Ahlquist) sowie 2-Methylamino-6-oxy-6-methylheptan (Jackson, Leimdorfer) als stark blutdruckaktive Substanzen. Auch Octinum (2-Methylamino-6-methylhepten) hat die gleichen pressorischen Eigenschaften, die nach den vorliegenden Ergebnissen in erster Linie auf eine Erregung der peripheren sympathischen Endapparate beruhen. Dafür sprechen insbesondere die Ergebnisse der Blutdruckversuche an Hund und Katze sowie am Nickhautpräparat der Katze und das Verhalten des Octinum gegen Cocain, Ephedrin, Yohimbin und Pendiomid.

Weiterhin sind die in der Reihe der Phenylalkylamine gefundenen Beziehungen zwischen Konstitution und Wirkung insoweit auf die aliphatischen blutdruckwirksamen Amine übertragbar, als auch bei diesen durch die Substitution der Aminogruppe mit einem längeren aliphatischen Radikal die gleichen charakteristischen Abwandlungen des Kreislaufeffektes im Sinne einer vorwiegenden Blutdrucksenkung eintreten, wie die Beobachtungen mit Octinum D beweisen. Selbst für diese gefäßerweiternde Substanz lassen sich unter geeigneten Versuchsbedingungen durch eine Vorbehandlung mit Ephedrin, Octinum und Pendiomid latente konstriktorische Gefäßwirkungen aufdecken, die wiederum durch eine Erregung der sympathischen Nervenendigungen bedingt sind. Dies beweist ihre Aufhebung durch Yohimbin und ihr Verhalten gegen Spartein. Auch die Ergebnisse am Nickhautpräparat der Katze legen diese Deutung nahe.

Schon Barger u. Dale haben darauf hingewiesen, daß die primären Amine unvollkommene sympathicomimetische Stoffe abgeben, indem sie neben ihrer hauptsächlich exzitatorischen Aktivität auch inhibitorische Wirkungen ausüben. Selbst bei Adrenalin und N-Äthyl-Adrenalin lassen sich derartige exzitatorische und inhibitorische Effekte nebeneinander nachweisen bzw. bei niedriger Dosierung sinkt der Blutdruck und erst bei größerer Dosierung steigt er an. Die höher alkylierten Derivate setzen diese Reihe fort, indem sie in jeder Konzentration nur mehr gefäßerweiternd wirken. Ebenso treten bei Arterenol, das selbst praktisch nur exzitatorische Gefäßwirkungen entfaltet, mit zunehmender Verlängerung der N-Nebenkette immer mehr die inhibitorischen Eigenschaften in den Vordergrund des Wirkungsbildes.

Man wird diese für die Phenylalkylamine geltende Deutung wohl auf das Octinum D übertragen dürfen, zumal gerade seine latenten konstriktorischen Wirkungen für einen derart gemeinsamen Wirkungsmechanismus sprechen. Es erscheint somit auch verständlich, daß Yohimbin keinen Einfluß auf den blutdrucksenkenden Octinum D-Effekt besitzt, da die Sympathicolytica nach der vorherrschenden Anschauung nur die exzitatorischen Receptoren blockieren können (Nickerson). Wenn man jedoch die exzitatorische sympathicomimetische Aktivität des Octinum D durch eine entsprechende Vorbehandlung mit Octinum bzw. Ephedrin oder Pendiomid steigert, so kann Yohimbin sehr wohl antagonistische Wirkungen entfalten und einen durch Octinum D verursachten Blutdruckanstieg bzw. eine Nickhautkontraktur beseitigen.

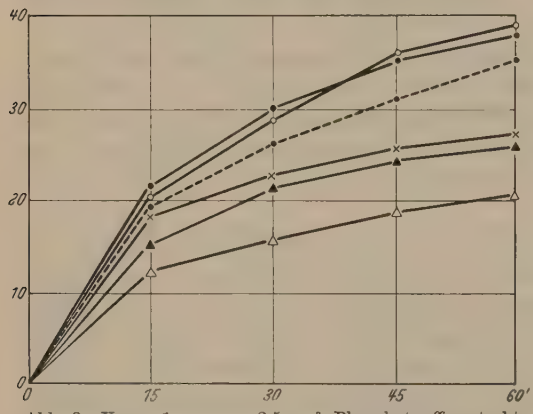


Abb. 2. Kurve 1: •——• 2,5 cm³ Phosphatpufferextrakt aus 0,5 g Meerschweinchenleber + 0,7 mg KCN + 0,03 m Mol Adrenalin Zahl der Einzelversuche 67. Kurve 2: ○——○ wie Kurve 1 + Octinum 1:50000. Zahl der Einzelversuche 12. Kurve 3: ×——× wie Kurve 1 + Octinum 1:20000. Zahl der Einzelversuche 10. Kurve 4: ▲——▲ wie Kurve 1 + Octinum 1:10000. Zahl der Einzelversuche 10. Kurve 5: △——△ wie Kurve 1 + Octinum 1: 5000. Zahl der Einzelversuche 13. Kurve 6: •- - -• wie Kurve 1 + Octinum D 1:5000. Zahl der Einzelversuche 10

Diese dem Octinum D eigenen exzitatorischen sympathicomimetischen Effekte, die aus ihrer Latenz durch eine Zugabe von Octinum aktiviert werden, bilden unseres Erachtens auch die Ursache, daß mit einer Kombination von Octinum und Octinum D in geeigneten Mischungsverhältnissen am Darm überadditive spasmolytische Wirkungen zu erzielen sind. Auf diese Weise wird trotz des grundsätzlich gleichartigen Wirkungsmechanismus beider Substanzen eine Steigerung der Wirkungsintensität erreicht, die man sonst nur in Mischpräparaten bei Substanzen mit verschiedenartigen Angriffspunkten zu sehen gewohnt ist.

Für die weitere Analyse des Wirkungsmechanismus des Octinum bieten die Untersuchungen von Fleckenstein eine Handhabe, da er zeigen konnte, daß in der Reihe der Phenylalkylamine eine Gruppe von sympathicomimetischen Substanzen existiert, deren Effekt auf die Nickhaut durch eine Denervierung bzw. Cocainisierung mehr oder weniger ausgelöscht wird. Dem entspricht das Verhalten des Octinum. Burn u. Tainter haben schon früher bei ihren Versuchen mit Tyramin gefunden, daß es an der denervierten Pupille nicht mehr anspricht. Das gleiche gilt

für Octinum, das nach den Untersuchungen von Brüggemann seine mydriatische Wirksamkeit nach der Degeneration der sympathischen Nervenendigungen weitgehend verliert. Man darf daher in Übertragung der Ergebnisse von Fleckenstein auf das Octinum für dieses folgern, daß seine Wirkung auf das Erfolgsorgan, d. h. auf die glatten Muskelfasern, keine direkte ist, sondern erst durch eine Zwischenschaltung der postganglionären, sympathischen Fasern zustande kommt. Hierbei besteht einerseits die Möglichkeit, daß Octinum die sympathischen Nervenfasern in Erregung versetzt und so eine vermehrte Abgabe des Überträgerstoffes Nor-Adrenalin veranlaßt. Andererseits kann seine Wirkung in einer Hemmung des Nor-Adrenalin-Abbaues bestehen, etwa durch einen Angriff an der Aminooxydase.

Zur Überprüfung dieser Fragestellung wurden in der Warburg-Apparatur der Einfluß von Octinum und Octinum D auf die Aminooxydase nach der von Heim angegebenen Methode bestimmt.

Tatsächlich fand sich in diesen Versuchen eine Hemmung des Fermentes durch Octinum, die bis zu Verdünnungen von 1:20000 deutlich ausgeprägt ist. Octinum D erwies sich dagegen ohne Einfluß auf die Aminooxydase. Es kann demnach unter der Einwirkung von Octinum eine Anhäufung des von der Nervenfaser kontinuierlich freigesetzten Nor-Adrenalin am Erfolgsorgan eintreten und so wenigstens teilweise der Octinum-Effekt zu erklären sein.

Nach den Beobachtungen am Hühneramnion üben Octinum und Octinum D keinen direkten spasmolytischen Einfluß auf die glatte Muskulatur aus.

Selbst der für Octinum nachgewiesene analgetische Effekt und seine verstärkende schmerzlindernde und entzündungshemmende Wirksamkeit beim Zusatz von Aminophenazon passen in das für Phenylalkylamine bekannte Wirkungsbild, da auch diese Substanzen teilweise eine analgetische Wirksamkeit entfalten.

So wurde insbesondere für Adrenalin und Ephedrin von zahlreichen Untersuchern an Tieren und Menschen nachgewiesen, daß sie schmerzstillend wirken (Zeigan, Weber, Schmidt, Gaisbock, Muir, Green, Wheatly, Cochrane, Maxwell, Buscaino, Kiessig). Das gleiche gilt für Desoxyephedrin, Amphetamin und andere Sympathicomimetica (Kiessig). Goetzl sowie Ivy haben außerdem beschrieben, daß Amphetamin einen synergetischen Effekt auf die Morphin-Analgesie ausübt. Weiterhin haben Fellows u. Ullyot eine größere Anzahl von Phenyläthylamin-Derivaten auf ihre analgetische Wirksamkeit getestet und unter diesen eine Reihe von schmerzstillenden Substanzen gefunden.

Für den gesamten Einflußbereich des Octinum, dessen Wirkungsmechanismus unseres Erachtens als der eines rein sympathicomimetischen Amins anzusehen ist, besteht demnach eine weitgehende Übereinstimmung mit dem Verhalten anderer sympathicotroper Substanzen. Auch das Octinum D ist in diese Gruppe einzuordnen. Die Änderung

seiner chemischen Konstitution bedingt allerdings, daß bei ihm im Wirkungsbild, ähnlich wie bei den entsprechend substituierten Phenylalkylaminen, die inhibitorischen sympathicomimetischen Effekte vorherrschen.

Zusammenfassung

Die Grundwirkung des Octinum besteht in einer Erregung der peripheren adrenergischen Nervenendigungen. Sie beruht, wie die Versuche an der denervierten und cocainisierten Nickhaut sowie die Beeinflussung der Aminooxydase nahelegen, nicht auf einer direkten Beeinflussung der Erfolgsorgane, sondern kommt erst durch eine Zwischenschaltung der postganglionären sympathischen Fasern zustande und ist mit einer Beeinflussung der Überträgersubstanz verknüpft. Das gleiche gilt für Hydro-Octinum.

Im Gegensatz zu Octinum und Hydro-Octinum lösen Octinum D sowie N-Isoamyl-1-phenylaminopropan am intakten Tier in einem mittleren Dosisbereich praktisch nur einen gefäßerweiternden, blutdrucksenkenden Mechanismus aus. Dieser ist nicht histaminartiger, cholinergischer oder sympathicolytischer, sondern peripherer, sympathicomimetisch-inhibitorischer Natur. Durch eine Vorbehandlung mit Octinum, Ephedrin oder Pendiomid können die sonst latenten constrictorischen Eigenschaften zum Vorschein kommen.

Am Darm des Meerschweinchens in vitro und in vivo ist Octinum D an Wirkungsintensität dem Octinum überlegen. Bei einer Kombination beider Substanzen in geeigneten Mischungsverhältnissen ergibt sich eine Steigerung der Wirkung, die über einen rein additiven Effekt hinausgeht, da in der Mischung die excitatorischen, sympathicomimetischen Eigenschaften des Octinum D durch Octinum aktiviert werden.

Im Gegensatz zu Octinum D ist Octinum analgetisch wirksam und führt in der Kombination mit Aminophenazon zu einer deutlichen Verstärkung der schmerzlindernden und entzündungshemmenden Wirkung. Hydro-Octinum ist in dieser Hinsicht dem Octinum unterlegen.

Literatur

Ahlquist, R. P.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **85**, 283 (1945); **81**, 235 (1944). — Amer. J. Physiol. **153**, 586 (1948). — J. Amer. Pharmaceut. Assoc., Sci. Ed. **32**, 151 (1943). — Balcet, C.: Boll. Ocul. **13**, 12 (1934). — Baltaceanu, G., H. Angelescu u. C. Vasiliu: Z. exper. Med. **98**, 221, 224 (1936). — Barger, G., and H. H. Dale: J. of Physiol. **41**, 19 (1910/11). — Bautzmann, H.: Anat. Anz. **100**, 135 (1953). — XIV. Int. Zool. Congr. Kopenhagen 1953. — Bautzmann, H., u. R. Schröder: Z. Anat. **117**, H. 3 (1953). — Bein, H. I., u. R. Meier: Schweiz. med. Wschr. **1951**, 446. — Biehler, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **178**, 101 (1935). — Naturforsch. Med. Dtschl. **62**, 83 (1939—46). — Bovet, D., et A. Simon: Arch. internat. Pharmacodynamie **52**, 413 (1936). — Brock, N., D. Lorenz u. H. Bartling:

Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 512 (1952). — v. Brücke, Th., u. H. Jesserer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **190**, 515 (1938) (s. auch Girndt). — Brüggemann, E.: Diss. Münster 1937. — Burn, J., and M. L. Tainter: Brit. J. Physiol. **71**, 167 (1931). — Buscaino u. Pero: Rass. Clin. **21**, 691 (1940) (zit. nach Fellows, E. J., and G. E. Ullyot). — Cameron, W. M., and M. L. Tainter: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **57**, 152 (1936). — Cavalli, F.: Arch. internat. Pharmacodynamie **64**, 354 (1940). — Chen, K. K., Ch. K. Wu and E. Henriksen: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **95**, 415 (1949). — Cochrane: Lancet **217**, 551 (1929) (zit. nach Fellows, E. J., and G. E. Ullyot). — Cochrane u. Mittra: Chinese Med. J. **42**, 697 (1928) (zit nach Fellows, E. J., and G. E. Ullyot). — Duesberg, R.: Dtsch. med. Wschr. **1949**, 529. — de Edds, F.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **24**, 551 (1927). — Engelhardt, G.: Arch. Path. u. exper. Pharmakol. **225**, 124 (1955). — Diss. Göttingen 1954. — Engelhardt, G., u. L. Lendle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 402 (1955). — Fellows, E. J., and G. E. Ullyot: 5. Kap. C. M. Suter: Med. Chem., New York, 1951, Verlag: Wiley & Sons. — Fleckenstein, A.: Brit. J. Pharmacol. **7**, 553 (1952). — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 117 (1953). — Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **59**, 17 (1953). — Fleckenstein, A., u. H. Bass: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **220**, 143 (1953). — Fleckenstein, A., and J. H. Burn: Brit. J. Pharmacol. **8**, 69 (1953). — Fleckenstein, A., u. D. Stöckle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 401 (1955). — Fliegenbaum, A.: Diss. Münster 1935. — Forst, A. W., u. R. Deininger: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 416 (1949). — Frank, H., u. E. Kirberger: Biochem. Z. **320**, 359 (1950). — Freund, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **180**, 209 (1936). — Gaddum, J. H., W. S. Peart and M. Vogt: J. of Physiol. **108**, 467 (1949). — Gaisbock, F.: Med. Klin. **1913**, 405. — Girndt, O.: Klin. Wschr. **1943**, 515. — Goetzl, F. R., D. Y. Burril and A. C. Ivy: Federat. Proc. **2**, 16 (1943). — Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **55**, 248 (1944). — Green: Trans. Roy. Soc. Trop. Med. London **22**, 367 (1929) zit. nach Fellows, E. J., and G. E. Ullyot). — Gruber, Ch. M.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **56**, 284 (1936). — Haas, H., E. Hohagen u. G. Kollmannsperger: Arzneimittel-Forsch. **3**, 238 (1953). — Haas, H., u. H. Kraft: Arzneimittel-Forsch. **4**, 249 (1954). — Heim, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 520 (1947). — Heimroth, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **116**, 245 (1926). — Heringmann, E., and J. Adriani: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **58**, 280 (1945). — Ing, H. R., G. S. Dawes and I. Wajda: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **85**, 85 (1945). — v. Issekutz, B., jr.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **177**, 389 (1935). — Orv. Hetil. **1934**, 790. — Ber. ges. Phys. **81**, 575 (1934). — Ivy, A. C., F. R. Goetzl and D. Y. Burill: War Med. **6**, 67 (1944). — Ivy, A. C., F. R. Goetzl, P. N. Harris and D. Y. Burill: Quart. Bull. Northw. Univ. Med. School **18**, 298 (1944). — Jackson, D. E.: Anesth. and Analg., N. Y. **26**, 64 (1947). — J. Labor. a. Clin. Med. **29**, 150 (1944). — J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **54**, 152 (1935). — South. Surgeon **13**, 890 (1947). — Kiessig, H. J., u. G. Orzechowski: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **197**, 391 (1941). — Kohlstaedt, K. G., and I. H. Page: Surg. etc. **16**, 430 (1944). — Konzett, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **197**, 27, 41 (1941). — Konzett, H., u. R. Rössler: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **195**, 71 (1940). — Kraushaar, A.: Arzneimittel-Forsch. **3**, 238 (1953); **4**, 273 (1954). — Lands, A. M.: Pharmacol. Rev. **1**, 279 (1949). — Amer. J. Physiol. **169**, 11 (1952). — Lands, A. M., and I. J. Grant: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **106**, 341 (1952). — Lands, A. M., F. P. Luduena, E. Ananenko and J. I. Grant: Arch. internat. Pharmacodynamie **83**, 692 (1950). — J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **99**, 45 (1950). — Lands, A. M., F. P. Luduena, I. J. Grant, E. Ananenko and M. L. Tainter: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **100**, 284 (1950). —

Lands, A. M., V. L. Nash, H. M. McCarthy, H. R. Granger and B. L. Dertiner: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **90**, 110 (1947). — Lands, A. M., V. L. Nash, B. L. Dertiner, H. R. Granger and H. M. McCarthy: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **92**, 367 (1948). — Lands, A. M., E. E. Rickards, V. I. Nash and K. Z. Hooper: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **89**, 297 (1947). — Lands, A. M., u. M. L. Tatiner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 76 (1943). — Le Compte, C. B.: Anesth. and Analg. N. Y. **25**, 168 (1946). — Leimdorfer, A.: Arch. internat. Pharmacodynamie **89**, 302 (1952). — Leo, E.: Münch. med. Wschr. **1933**, 1470. — Lichtfield, J. D., and F. Wilcoxon: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **96**, 99 (1949). — Lockett, M. F.: Brit. J. Pharmacol. **5**, 485 (1950). — Marsh, D. F.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **94**, 225 (1948). — Marsh, D. F., and D. A. Herring: Arch. internat. Pharmacodynamie **78**, 489 (1949). — Marsh, D. F., M. H. Pelletier and C. A. Ross: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **92**, 108 (1948). — Maxwell, S. S.: Chin. Med. J. **42**, 694 (1928). — Mügge, H.: Klin. Wschr. **1933**, 381. — Muir, E.: Proc. Roy. Soc. Med. **20**, 997 (1927). — Muir, E., and K. K. Chatterge: Indian Med. Gaz. **63**, 198 (1928). — Muñoz, D. S. C.: Diss. Santiago de Chile 1937. — Mura, F., and G. Casà: Boll. Ocul. **16**, (1937). — Nickerson, M.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **95**, 27 (1949). — Pack, Ch. and B. E. Read: Chin. J. Physiol. **2**, 433 (1928); zit. n. Chemiker-Ztg. **1929**, II, 189. — Page, I. H., and R. D. Taylor: J. Amer. Med. Assoc. **135**, 348 (1947). — Péterfi, T.: Anat. Anz. **45**, 161 (1931). — Proetz, A. W.: Ann. of Otol. **51**, 112 (1942). — Arch. Otolaryng. **37**, 15 (1943). — Raymond-Hamet: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **160**, 1 (1931). — Régniers, P., and G. de Vleeschouver: Arch. internat. Pharmacodynamie **50**, 65 (1935). — C. r. Soc. Biol. (Paris) **115**, 426 (1953). — Rohrmann, E., and H. H. Shonle: J. Amer. Chem. Soc. **66**, 1515 (1944). — Roman-Vega, D. A., et J. Adriani: Anesth. et Analg. **23**, 248 (1944). — South. Med. J. **38**, 635 (1945). — Anesth. **7**, 62 (1946). — Samaan, K.: Quart. J. Pharmacol. **10**, 212 (1937). — Samaan, K., and K. Saad: Quart. J. Pharmacol. **9**, 647 (1936). — Savini, E.: Arch. internat. Pharmacodynamie **82**, 127 (1950). — Schmidt, R.: Med. Klin. **1912**, 1485. — Scholten, C.: Med. Mschr. **1952**, 245. — Schulte, J. W., E. C. Reif, J. A. Bacher, W. S. Lawrence and M. L. Tainter: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **71**, 62 (1941). — Sonnemberg, G.: Arch. Ital. Sci. Farm. **1935**, Nr. 1. — Stoehr, Ph.: zit. n. G. Engelhardt. — Tainter, M. L.: Arch. internat. Pharmacodynamie **46**, 192 (1933). — Tainter, M. L., and D. K. Chang: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **30**, 193 (1927). — Tripod, J.: Helvet. physiol. Acta **9**, 1 (1951). — Verzàr, F.: Pflügers Arch. **158**, 419 (1941). — Walton, R. P., C. B. Preacher and W. M. Cannon: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **92**, 214 (1948). — Weber, E.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **21**, 616 (1904). — Wheatley, A. W.: Ann. Rep. Med. Dept. Strait. Settl. **18**, 71 (1927). — Wiechmann, R.: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **13**, 454 (1938). — Zeigan, F.: Ther. Mh. **18**, 193 (1904).

Prof. Dr. H. Haas, Pharmakol. Laboratorium d. Knoll AG., Ludwigshafen/Rhein

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 93—110 (1955)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn (Direktor: Professor Dr. Dr. W. Schulemann) und dem Pathologischen Institut der Universität Bonn (Direktor: Professor Dr. H. Hamperl)

Zur Wirkung von Toluylendiisocyanat (Desmodur T) auf die Atemwege

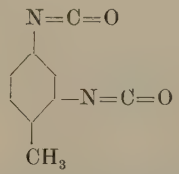
Von

H. Friebel und H. Lüchtrath

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Mai 1955)

Toluylendiisocyanat („Desmodur T")



wird neben anderen Diisocyanaten technisch zur Herstellung von Kunststoffen verwandt. Die klare, farblose, eigenartig riechende Flüssigkeit bildet, wenn sie nach dem von Bayer u. Mitarb. 1937 entwickelten „Diisocyanat-Polyadditionsverfahren" mit Polyestern („Desmophen") in Reaktion tritt, Polyurethane. Infolge seiner ungewöhnlich hohen chemischen Reaktivität verbindet sich Toluylendiisocyanat leicht mit primären Aminogruppen, mit Wasser, Alkoholen, Carbonsäuren, Phenolen und generell mit Stoffen, die ein durch Alkalimetall ersetzbares Wasserstoffatom haben. Reaktionsprodukte der Desmodur-Desmophenvernetzung sind als Schaumstoffe, Lacke, Kleber oder sonstige Kunststoffe im Gebrauch. Die vielseitige Anwendung hat zur Folge, daß Desmodur T und Desmodur T-haltige Produkte in zahlreichen Betrieben der Schaumstoff-, Lack-, Farben- sowie Textilindustrie ver- und bearbeitet werden, daß darüber hinaus aber auch Angehörige anderer Industriezweige und einiger Handwerksbetriebe mit ihnen in Berührung kommen.

Während der Entwicklung und bei der Produktion dieser Kunststoffe wurde das Auftreten eines eigenartigen Krankheitsbildes beobachtet, das durch die Einwirkung von noch nicht vernetztem Desmodur auf den Organismus zustande kommt. Je nach dem Ort der unmittelbaren Einwirkung, z. B. auf die Haut oder Schleimhäute können Dermatitis, Schleimhautreizungen, Husten, Bronchitis, asthmatoide Bronchitis bzw. eigenartige asthmaähnliche Krankheitssymptome auftreten.

Über die Symptomatik der Desmodur-Schäden ist im deutschen Schrifttum von Reinl sowie von Ganz und Mager berichtet worden. Aus Frankreich sind Beobachtungen von Fuchs und Valade, aus Schweden von Swensson, Holmquist und Lundgren veröffentlicht worden. Tierexperimentelle Untersuchungen

wurden 1941 erstmalig von E. Gross u. Hellrung und später von S. Fuchs u. P. Valade durchgeführt.

In den Versuchen dieser Autoren wurden Hunde, Katzen, Kaninchen, Meerschweinchen mehrere Stunden lang einer Atmosphäre ausgesetzt, die pro Liter Luft 0,1—10 mg Desmodur T enthielt. Schon bei den niedrigen Konzentrationen kam es zu Tränenfluß und Irritation der Atemwege (Schnupfen, Husten, Polypnoe); die höheren Konzentrationen verursachten Bronchitis, Pneumonie und Lungenödem. Ein Teil der Tiere starb mehrere Tage oder Wochen nach der Inhalation. Die erwähnten Autoren haben bei ihren Tierversuchen einige Krankheitssymptome, die beim Menschen im Anschluß an eine einmalige massive oder wiederholte geringere Desmodur T-Inhalationen immer wieder beobachtet werden, vor allem die asthmatoiden Zustände, nicht gesehen und konnten infolgedessen keine Erklärung für sie geben.

In der vorliegenden Arbeit soll daher der Versuch gemacht werden, diese beim Menschen beobachteten Krankheitsbilder im Tierversuch möglichst vollkommen nachzuahmen und ihre Pathophysiologie aufzuklären. Ausgegangen wurde von der naheliegenden Erwartung, daß Desmodur T in ähnlicher Weise wie bei der technischen Anwendung mit dem Körpereiweiß reagiert und daß die Reaktionsprodukte bzw. hierdurch bedingte Folgeerscheinungen die Krankheitszustände verursachen. Dementsprechend wurde zunächst versucht, solche Beziehungen durch eine grobe Applikation von Desmodur T in Luftröhrenäste herzustellen, nachzuweisen und in ihrem Verhalten zu studieren.

I. Versuche mit intratracheal injiziertem Desmodur T

Intratracheale Injektion von 0,3 cm^3 an 3 Meerschweinchen in Urethan-Narkose unter Freilegen der Trachea. Meerschweinchen Nr. 1 erhielt Desmodur T, Meerschweinchen Nr. 2 eine Mischung von Desmodur T und Glykolmonomethylätheracetat im Verhältnis 1:50, Meerschweinchen Nr. 3 ein frisch hergestelltes Gemisch von Desmodur T und 1,2-Propylenglykol 1:50. (In Gemischen von 1,2-Propylenglykol mit Desmodur kommt es zur Polyurethanbildung und damit zur Inaktivierung von Desmodur. Die Verdünnung von Desmodur wurde daher unmittelbar vor der Anwendung vorgenommen.)

Das mit unverdünntem Desmodur T behandelte Tier wurde 10 min nach der Injektion durch Nackenschlag getötet. Bei der Sektion zeigten sich in der Lunge Kollapsherdchen in beiden Unterlappen, im linken Mittellappen und beiden Spitzen. Nach Fixierung in Formalin wurden vorwiegend in den paravertebralen Abschnitten, aber auch an anderen Stellen oberflächliche, die Schnittfläche leicht überragende Einlagerungen in die Alveolen von grau-roter bis gelblicher Farbe mit deutlicher Läppchenzeichnung sichtbar. Das Gewebe war derb und kaum lufthaltig.

Bei der histologischen Untersuchung findet sich in der Trachea die injizierte Flüssigkeit erstarrt in Form körniger Massen, die eine deutliche Doppelbrechung im polarisierten Licht ergeben (Abb. 1). Vielfach haben sie sich auch zu größeren Schollen zusammengelagert. Sie sind in den Bronchien und über die feineren Bronchialverzweigungen bis in die Lunge

hinein nachweisbar, wo sie gleichfalls als körnige Gebilde in den Alveolen liegen. An allen Berührungsstellen zwischen Desmodur und dem Gewebe sieht man eine deutliche Veränderung der Färbbarkeit. Das Cytoplasma der Bronchialepithelien erscheint bei Hämalaunfärbung intensiv dunkelrot, während an den Kernen nichts Auffälliges festzustellen ist. Zahlreiche Erythrocyten, die offenbar durch den operativen Eingriff in die Luftröhre gelangt sind, weisen in der Umgebung der Injektionsmasse eine schmutziggelbe Tönung auf. Auch die Alveolarsepten sind deutlich

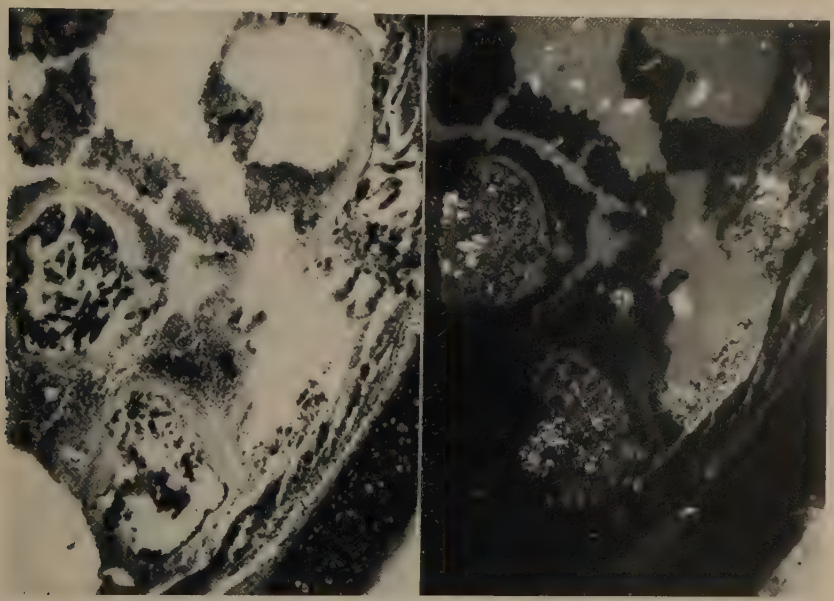


Abb. 1. Intratracheale Injektion von Desmodur. Körnige und schollige Massen, links bei normalem, rechts bei polarisiertem Licht. Zersplitterung der Trachealschleimhaut (rechts am Bildrand). Häm. Eosin, etwa 95fach

dunkler gefärbt. Die roten Blutkörperchen in den Septencapillaren sind ebenfalls gelblich. Außerdem ist die Schneidbarkeit des Gewebes herabgesetzt. Die Tracheal- und Bronchialschleimhaut erscheint spröde und weist feine Bruchlinien auf. Teilweise sind Schleimhautstücke von der Unterlage abgerissen und haben sich übereinandergeschoben.

Die intratracheale Injektion von unverdünntem Desmodur T bewirkt offenbar eine sofort einsetzende „Fixierung" (im Sinne der histologischen Technik) und Härtung der oberflächlichen Zellschichten der Bronchialschleimhaut. Bei diesem Prozeß bleibt die Zellstruktur, abgesehen von einer gewissen Gewebsschrumpfung, nahezu unverändert erhalten. Zu einer Kontraktion der Bronchialmuskulatur und der Schleimhaut kam es nach der Einwirkung von unverdünntem Desmodur T nicht.

Erwartungsgemäß wurden nach dieser kurzen Versuchszeit keine entzündlichen Reaktionen gefunden.

Bei den beiden mit einem Gemisch von Desmodur T und Lösungsmittel behandelten Tieren trat nach 10 min der Tod spontan ein. Die histologischen Befunde stimmten weitgehend überein. Bei dem Tier, dem Desmodur in Glykolmonomethylätheracetat appliziert worden war, fiel eine Verlegung der Bronchiallumina durch Schleimhautschollen und -knäuel auf. Darüber hinaus konnten keine Veränderungen nachgewiesen werden, die über die Desmodurwirkung hinausgehen und durch die Verdünnungsmittel bedingt sein könnten. Offenbar genügt auch die geringe Desmodurmenge, um entsprechende Veränderungen hervorzurufen.

Die Befunde legen den Rückschluß nahe, daß die Schleimhaut bei Berührung mit Desmodur *T* „erstarrt" (gewissermaßen im Sinne einer Gewebsfixation) und sich an die Formveränderungen der Unterlage nicht mehr anpassen kann. *2,4-Toluylendiisocyanat geht also mit dem Zelleiweiß eine Verbindung ein, die so rasch zum Zelltod führt, daß typische histologische Veränderungen im Sinne einer Nekrose nicht erkennbar werden.*

In weiteren Versuchen wurde geprüft, ob die bei intratrachealer Injektion beobachteten Veränderungen auch unter Verhältnissen eintreten, wie sie bei der technischen Anwendung von Desmodur T bestehen, und welche Spätfolgen nach schweren Desmodur-Schädigungen auftreten. Die Tiere wurden mehrmals Desmodur T-haltigem Aerosol oder Desmodur T-Dampf ausgesetzt.

II. Versuche mit Desmodur T-Aerosol[1]

Meerschweinchen beiderlei Geschlechts von mindestens 300 g inhalierten in unregelmäßigen Abständen (4 Tage bis 1 Monat) jeweils 10 min lang ein Aerosol, das entweder aus einem Lösungsmittel für Desmodur T oder einem Gemisch von Desmodur und Lösungsmittel bestand. Als Verneblungsgerät wurde die von Friebel u. Basold beschriebene Apparatur verwandt. Bei den Versuchen mit Desmodur T in Glykolmonomethylätheracetat 1:50 als Inhalat (Luftdurchfluß 6 l/min bei 1,25 atü Arbeitsdruck) befanden sich in 1 l Luft 60 mg Inhalat = 1,2 mg Desmodur T. Meerschweinchen inhalieren unter diesen Bedingungen in 10 min schätzungsweise maximal 2,3 mg, wahrscheinlich aber erheblich weniger Desmodur T. Die Atmung der Tiere wurde während des Versuchs fortlaufend kymographisch aufgezeichnet, das Verhalten der Tiere während und nach der Inhalation überwacht. Sie wurden in der warmen Jahreszeit im Freien, im Herbst und Winter in geheiztem Raum verwahrt; Fütterung entsprechend dem jahreszeitlichen Frisch- oder Trockenfutterangebot.

18 der insgesamt 37 Meerschweinchen waren etwa 10—14 Monate vor diesen Versuchen mit Hühnereiweiß sensibilisiert worden und hatten im Anschluß daran mehrere Anfälle von allergischem (durch Eiweißaerosol ausgelöstem) Asthma durchgemacht. Von anderen erstmalig zu Versuchen verwandten Meerschweinchen erhielten 9 etwa 4 Wochen vor der ersten Inhalation von Desmodur T im Abstand von 3 Tagen 2 subcutane, zum Teil auch intraperitoneale Injektionen von je 0,5 cm^3 eines

[1] Als „Aerosol" wird hier ein Nebel bezeichnet, dessen Tröpfchen zum überwiegenden Teil einen Durchmesser von 0,5—5,0 μ haben.

Breies aus Meerschweinchenhirn und Desmodur T (1 ganzes Hirn + 0,5 cm³ Desmodur T + 5 cm³ physiologische Kochsalzlösung) bzw. von Meerschweinchenserum und Desmodur T (10 cm³ Serum + 1 cm³ Desmodur T, verdünnt mit der gleichen Menge Wasser). Tiere, bei denen sich asthmatoide Zustände herausbildeten, wurden zum Teil mit broncholytisch wirkenden Aerosolen (Adrenalin oder N-Isopropylnoradrenalin) behandelt. Die Lungen, Lebern, zum Teil auch Milzen und Nieren von 21 der 37 Versuchstiere wurden feingeweblich untersucht.

1. Kontrollversuche mit den Lösungsmitteln

1,2-Propylenglykol wurde ohne jede Reizerscheinung der Atemwege vertragen. *Glykolmonomethylätheracetat* verursachte Tränen- und Speichelfluß sowie Rhinitis. Die Tiere unternahmen Befreiungsversuche. Zittern, Zappeln, Zucken und Kauen traten bei den späteren Versuchen häufiger auf. Fast alle Tiere niesten nach Beendigung der Inhalation, Husten wurde aber niemals beobachtet. Manchmal trat eine Verlangsamung der Atmung ein, seltener beschleunigte Atmung, nur 2mal bei insgesamt 40 Versuchen nahm die Atmung vorübergehend asthmatoiden Charakter an. Im Zeitraum von 2 Monaten wurden mit jedem Tier 6 Inhalationsversuche durchgeführt. Auch beim letzten Versuch waren alle Reizerscheinungen flüchtig; längerdauernde Nachwirkungen wurden nicht beobachtet.

2. Versuche mit Desmodur T in Glykolmonomethylätheracetat

a) Dieselben Tiere, die zuvor als Kontrolltiere dienten, wurden einen Monat nach der letzten Inhalation von reinem Glykolmonomethylätheracetat einmal einem Aerosol ausgesetzt, das Desmodur T in Glykolmonomethylätheracetat 1:50 enthielt. Neben den vorher beschriebenen Symptomen hatten 5 von 7 Tieren nach Abschluß der Inhalation einen mehrere Stunden anhaltenden Husten. Die Atmung war bei allen Tieren wesentlich stärker verlangsamt, sie nahm während des Versuches bei 5 von 7 Tieren vorübergehend asthmatoiden Charakter an.

b) Weitere 11 Meerschweinchen, die einige Monate vor dem Versuch mit Hühnereiweiß sensibilisiert worden waren und durch Hühnereiweiß ausgelöste allergische Asthmaanfälle durchgemacht hatten, erhielten im Zeitraum von 3 Monaten 7 Inhalationen von Desmodur T (gemischt mit Glykolmonomethylätheracetat oder 1,2-Propylenglykol 1:100 bzw. 1:50). Desmodur T in Glykolmonomethylätheracetat verursachte Symptome, wie im Absatz a) beschrieben. — Desmodur T unmittelbar vor dem Versuch in 1,2-Propylenglykol gelöst rief geringere Reizerscheinungen hervor. Nur bei einzelnen Tieren traten Niesen, Augentränen, verlangsamte Atmung, asthmatoider Atemtyp und Husten auf. Zittern, Zucken und Zappeln waren aber häufig. Bei einem Meerschweinchen blieb nach der 6. Inhalation die erschwerte und vertiefte Atmung mit deutlich sichtbarer Inanspruchnahme der Bauchpresse tagelang bestehen. Ein

Tier starb etwa einen Monat nach der 6. Inhalation. Die Sektion ergab eine eitrige Pneumonie. Die im ganzen mildere Wirkung des in 1,2-Propylenglykol gelösten Desmodur erklärt sich durch die fortschreitende Bildung von Polyurethanen im Gemisch, die keine Schädigung hervorrufen.

c) 10 etwa 250 g schwere Meerschweinchen, die erstmalig zu Versuchen herangezogen wurden, erhielten bei der ersten Inhalation Desmodur T frisch gelöst in 1,2-Propylenglykol. Hier wurde nur Schnupfen beobachtet. Als bei den folgenden 6 Inhalationen Desmodur T in Glykolmonomethylätheracetat verabreicht wurde, trat bei der Mehrzahl der Tiere zusätzlich Niesen, Tränen- und Speichelfluß, verlangsamte Atmung und Husten auf. Von der 3. Inhalation an nahm die Atmung bei einer immer größeren Anzahl von Tieren zunehmend asthmatoiden Charakter an. Dieser asthmatoide Atemtyp überdauerte bei einigen Tieren die Inhalation um Stunden und Tage. Nach der 3. Inhalation wurden 3 Tiere getötet und ihre Lungen feingeweblich untersucht. Nach der 4. Inhalation wurde ein weiteres Tier getötet, weil es seine asthmatoide Atmung nicht mehr verlor und einen schwerkranken Eindruck machte. Nach der 5. Inhalation starben weitere 2 Meerschweinchen, nach der 6. ein Tier. Bei ihnen bestand ein starkes Lungenemphysem neben Kollapsherden sowie Stauungszeichen als Folge der Überlastung des rechten Herzens. Von den restlichen 3 Tieren hatte ein Meerschweinchen ständige asthmatoide Atmung.

d) Eine weitere Serie von 9 Tieren wurde mit einem s. c. bzw. i. p. verabreichten Brei aus Desmodur T und Meerschweinchenhirn bzw. Meerschweinchenserum vorbehandelt. Bei der 1. und 2. Inhalation von Desmodur T, das kurz vorher in 1,2-Propylenglykol gelöst worden war, traten die gleichen Symptome wie unter a) und b) auf. Die 3. Inhalation wurde mit Desmodur T in Glykolmonomethylätheracetat 1:50 durchgeführt. Hier kam es bei der Mehrzahl der Tiere zu stark verlangsamter Atmung und zum Husten. Außerdem hatte ein Tier 5 Stunden nach der Inhalation eine frequente asthmatoide Atmung, die im Typ von einem richtigen allergischen Asthmaanfall kaum zu unterscheiden war. 3 Tage nach der 3. Inhalation starben 4 Meerschweinchen. Gleichzeitig wurden von 3 weiteren Tieren, die eine bleibende asthmatoide Atmung hatten, 2 getötet. Von den restlichen Tieren starb eines nach der 5. Inhalation, die beiden übrigen überlebten die 8. Inhalation, waren aber offensichtlich schwer krank. Die Lungen aller Tiere zeigten nebeneinander emphysematöse und kollabierte Bezirke. Außerdem bestanden Zeichen cardialer Stauung.

In der Tab. 1 ist eine abgekürzte Übersicht über das Verhalten der Tiere *während* der Inhalation gegeben. *Nach* der Inhalation wurden nur noch 2 Symptome beobachtet: Husten und asthmatoide Atmung. Der

asthmatoide Atmungstyp trat in einzelnen Fällen einige Minuten, in anderen erst mehrere Stunden nach der Inhalation auf. Bei wiederholten Inhalationen blieb der asthmatoide Atmungstyp ständig erhalten, schließlich starben die Versuchstiere. Als Todesursache kommen vorwiegend Erstickung und Herzversagen in Frage.

Meerschweinchen, die erstmalig zu Versuchen gebraucht wurden, verhielten sich nicht anders als Tiere, die früher schon eine Reihe allergischer

Tabelle 1. *Verhalten der Meerschweinchen während der Inhalation von Desmodur T und seinen Verdünnungsmitteln*

	Schnupfen	Niesen	Tränenfluß	Speichelfluß	Verlangsamte Atmung	Asthmatoider Atemtyp	Husten	Befreiungsversuche	Zappeln, Zittern	Kauen
1,2 Propylenglykol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Glykolmonomethyläitheracetat	+	+	+	+	(+)	—	—	(+)	(+)	(+)
Desmodur T + 1,2 Propylenglykol	++	(+)	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	(+)
Desmodur T + Glykolmonomethylätheracetat	++	+	++	+	++	+	++	+	++	(+)

++ = alle oder fast alle Tiere,
+ = mehrere Tiere,
(+) einzelne Tiere zeigten das Symptom.

Asthmaanfälle durchgemacht hatten. Tiere, bei denen eine Sensibilisierung durch ein Gemisch von Desmodur T mit Meerschweineneiweiß versucht worden war, und nichtvorbehandelte Meerschweinchen, zeigten kein grundsätzlich verschiedenes Verhalten. Die vorbehandelten Meerschweinchen erkrankten lediglich etwas früher. Die Versuche sind aber zahlenmäßig zu klein, um eine echte Differenz zu beweisen.

Als der wesentlichste Befund wird das Auftreten der eigenartigen asthmatoiden Atmung angesehen, die durch wiederholte Inhalationen von Desmodur T-haltigen Aerosolen bei der Mehrzahl der Versuchstiere hervorgerufen wurde. Im folgenden wird zu ermitteln versucht, ob diese pathologische Atmung bronchospastisch bedingt ist oder andere Ursachen hat.

3. Versuche mit broncholytisch wirkenden Mitteln

Die Inhalation eines *Adrenalin*-Aerosols (M/250 Lösung), das Anfälle von echtem allergischem Asthma in jedem Fall beseitigt, hatte auf die durch Desmodur T hervorgerufene asthmatoide Atmung keine Wirkung, während das kräftiger wirkende N-Isopropylnoradrenalin (M/1000 Lösung), als Aerosol verwandt, eine bestehende Dyspnoe erleichterte, wenn auch nicht ganz beseitigte. Daraus darf wohl gefolgert werden, daß die durch Desmodur verursachte asthmatoide Atmung nur

zum Teil bronchospastisch bedingt ist und eine zusätzliche, andersartige Behinderung des Gasaustausches angenommen werden muß, über die dank der histologischen Untersuchung Aufschluß erhalten wurde.

Meerschweinchen Nr. 242, vorbehandelt mit Desmodur T-Meerschweinchen-eiweiß-Gemisch; Zustand erheblicher und ständiger Dyspnoe nach 8maliger Inhalation von Desmodur T. Letzte Inhalation 4 Tage vor der 35 min dauernden Inhalation von M/1000 N-Isopropylnoradrenalin. Der asthmatoide Atmungstyp mit den eigenartigen Knickungen im in- und exspiratorischen Schenkel der Atemkurve war 30 min nach Inhalationsbeginn verschwunden. Bei der Beobachtung des Tieres fiel aber auch dann noch die forcierte Mitarbeit der Bauchdeckenmuskulatur bei der Atmung auf. Die Dyspnoe wurde durch das Broncholyticum erleichtert, aber nicht beseitigt.

Meerschweinchen Nr. 250. Das Tier hatte 7mal Desmodur T inhaliert. 2 Tage nach der letzten Inhalation bestand ein mittelschwerer asthmatoider Zustand, der mit N-Isopropylnoradrenalin zwar erleichtert, aber nicht vollkommen beseitigt werden konnte.

4. Histologische Untersuchung

Von 21 mit Desmodur T behandelten Meerschweinchen wurden Lungen, Leber, Milz und Nieren feingeweblich untersucht. Dabei handelte es sich a) um Tiere, die lediglich mehrfach das Aerosol inhaliert hatten, b) um solche, die den Inhalationen vorausgehende allergische Asthmaanfälle durch Hühnereiweiß durchgemacht hatten, und c) um Meerschweinchen mit parenteraler Applikation von Meerschweinchenhirn und -serum + Desmodur T vor der Aerosolbehandlung. Die erhobenen Gewebsbefunde sind im wesentlichen gleich und können gemeinsam beschrieben werden.

Makroskopisch besteht bei den Tieren ein deutliches, wechselnd starkes Lungenemphysem mit kleineren und größeren Kollapsherden. Mikroskopisch finden sich als ganz frische Veränderungen herdförmige Fixierungsnekrosen im Bronchialepithel, vorwiegend im Bereich der größeren und mittleren Luftröhrenäste, die sich durch zahlreiche pyknotische Kerne auszeichnen. Die durch Desmodur zu Fremdkörpern gewordenen Schleimhautteile sind zum Teil von der Unterlage abgelöst, besonders wenn sie im Kontraktionszustand „erstarrt" sind (Abb. 2, 3). Anderenorts findet sich das Epithel durch Leukocyten oder durch ein aus der Wand vorwachsendes Granulationsgewebe abgehoben und füllt mit diesem die Bronchiallichtung aus (Abb. 3 u. 4). Inmitten des leukocytären Exsudates sind auch nach länger zurückliegender Inhalation nekrotische Epithelstücke nachzuweisen (Abb. 4), die offenbar zunächst dem fermentativen Abbau der weißen Blutkörperchen widerstehen. Durch Herauslösen des Kernchromatins blaßt jedoch die Kernstruktur langsam ab und verschwindet.

Die Mehrzahl der Luftröhrenäste zeigt als Folge dieser Vorgänge eine schwere eitrige Bronchitis. Andererseits beobachtet man auch regenerative Vorgänge mit Neubildung des Epithels selbst bei schwer veränderten Bronchien. Dabei sind gelegentlich auch Hyperplasien des Bronchialepithels und kubisch vergrößerte Alveolarepithelien nachweisbar (Abb. 5) sowie ausgedehnte Plattenepithelmetaplasien der Bronchialschleimhaut. Als weitergehende Veränderungen finden sich in vielen Lungen größere Bronchialabschnitte mit Pfröpfen aus Granulationsgewebe verlegt. Das histologische Bild entspricht einer Bronchiolitis obliterans (Abb. 6 und 7). Offenbar

stellt die durch Desmodur bedingte besondere Form der Schleimhautnekrose einen Reiz für diesen Vorgang dar. Er führt nicht immer zu einem vollständigen Verschluß. Gelegentlich ist die Restlichtung mit neugebildetem Epithel ausgekleidet (Abb. 6).

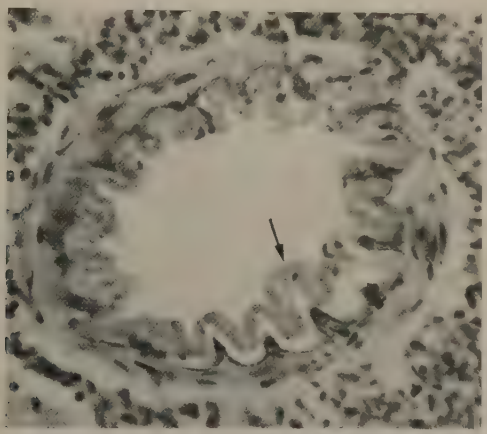


Abb. 2. Tier Nr. 1597. Nekrotische Schleimhaut mit Verlust der Kernfärbbarkeit ↙. Geringe Infiltration um den Bronchus. Häm. Eosin, etwa 338fach

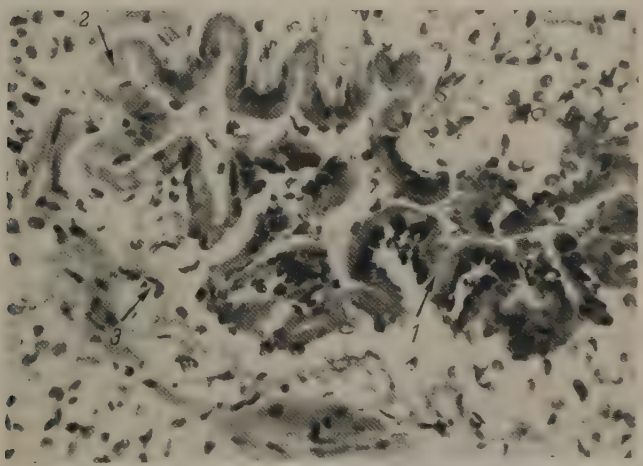


Abb. 3. Im Kontraktionszustand „fixierte", in die Lichtung abgestoßene Schleimhaut mit pyknotischen Kernen *1* und Verlust der Kernfärbbarkeit *2* in einzelnen Abschnitten. Durch die Wand vorwachsendes Granulationsgewebe *3*. Häm. Eosin, etwa 338fach

Die Lungen weisen häufig ausgedehnte eitrige pneumonische Herde auf, das Zwischengewebe eine stärkere Vermehrung von histiocytären Zellen, manchmal einer interstitiellen Pneumonie ähnlich. Hin und wieder treten auch eosinophile Leukocyten auf, ohne im allgemeinen eine stärkere Häufung erkennen zu lassen.

In der Leber, der Milz und den Nieren ist eine deutliche Hyperämie festzustellen. Nennenswerte pathologische Befunde können an diesen Organen nicht erhoben werden.

Bei der feingeweblichen Untersuchung wurden somit zusammenfassend folgende Ursachen für die Behinderung des Gasaustausches und

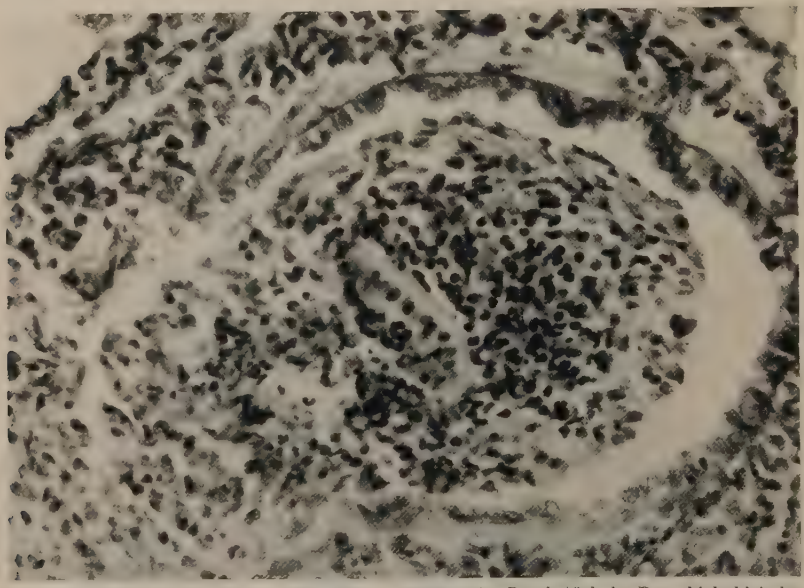


Abb. 4. In Granulationsgewebe eingeschlossenes, transparentes Bruchstück der Bronchialschleimhaut in „fixiertem" Zustand mit erhaltener, aber geschwächter Kernfärbbarkeit. Häm. Eosin, etwa 350fach

für die resultierende Dyspnoe gefunden: Pneumonische Prozesse von wechselndem Ausmaß, Bronchitis und Peribronchitis mit Schleimhautverlust und zum Teil geschwüriger Zerstörung der Bronchialwand, Verlegung der Bronchiallumina durch zusammengedrückte oder -geballte Schleimhaut und Schleimhautreste, durch Granulombildung, Eiter und Schleim, Anfüllung mit leukocytärem Exsudat, mit histiocytären Zellen bzw. Granulationsgewebe, Umwandlung des respiratorischen Epithels in kubisches, zum Teil zylindrisches Epithel. Auffallend ist, daß auch nach der Inhalation von vernebeltem Desmodur T die geschädigte Schleimhaut „erstarrt". Die nekrotisch gewordenen Anteile lösen sich zum Teil schlecht

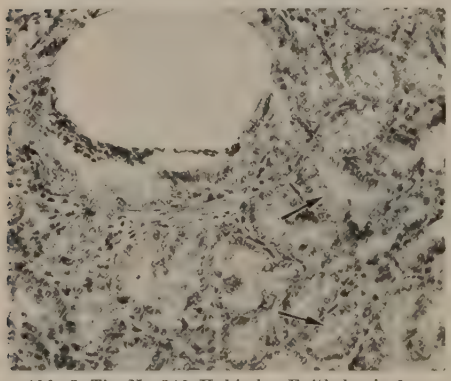


Abb. 5. Tier Nr. 246. Kubisches Epithel ↙ in den Alveolen. Häm. Eosin, etwa 135fach

von der vital gebliebenen Unterlage ab. Sie werden von Granulationsgewebe umgeben und in das Bronchiallumen hineingeschoben. Sie

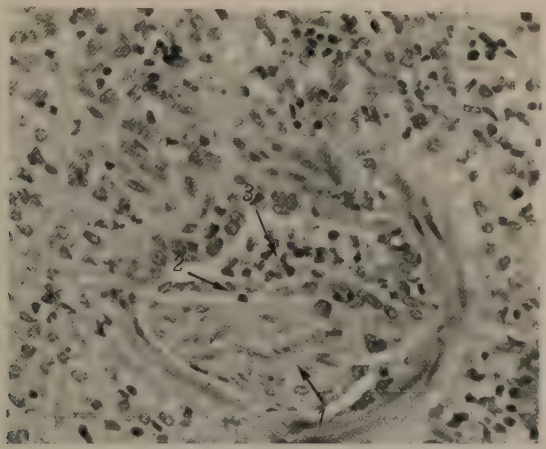


Abb. 6. Tier Nr. 244. Teilweiser Verschluß eines kleinen Bronchus durch vernarbendes Granulationsgewebe *1*. Darüber Epithel *2*. In der Restlichtung Leukocyten *3*. Häm. Eosin, etwa 338fach

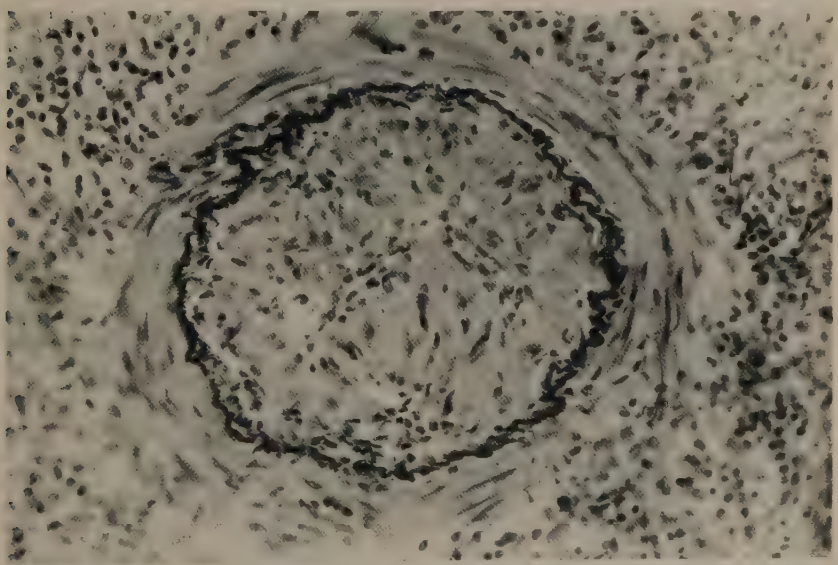


Abb. 7. Tier Nr. 209. Völliger Verschluß eines Bronchiolus durch Granulationsgewebe. Bronchiolitis obliterans. Häm. Elastika, etwa 250fach

zerfallen nicht wie gewöhnliches nekrotisches Gewebe, sondern bleiben längere Zeit als Fremdkörper im Granulationsgewebe unverändert liegen. Bronchitis und Peribronchitis sind Sekundärfolgen. Bei wieder-

holten Inhalationen in mehrtägigem Abstand finden sich außer Destruktion auch reparative Vorgänge. Die beobachteten Spasmen der Bronchialmuskulatur werden offenbar durch die toxische Reizung der Atemwege hervorgerufen.

III. Versuche mit Desmodur T-Dampf

Die Versuchstiere wurden in unregelmäßigen Abständen (1—10 Tage) jeweils zunächst 10 min, später 20 min lang in einem Behälter verwahrt, der von einem Desmodur T-Dampf-Luftgemisch durchströmt wurde. Zu diesem Zweck wurde die unter II genannte Apparatur abgeändert. Der Luftstrom (5 l/min) wurde bei diesen Versuchen nicht durch den Vernebler des Gerätes, sondern nach Trocknung in einer Chlorcalciumsäule durch die Strömungsapparatur von Flury u. Wirth geleitet. Diese Apparatur wurde durch einen elektrischen Heizstrahler erwärmt (Temperaturanstieg des fließenden Desmodur-Luftgemisches auf 34—36° C, des auf dem Boden des Verdampfungsgefäßes sich ansammelnden Desmodur T auf 40—42°). Unter diesen Bedingungen enthielt 1 l des Luft-Dampfgemisches 0,35—0,55 mg Desmodur T, von dem die Meerschweinchen innerhalb von 20 min maximal 1,4 bis 2,2 mg Desmodur inhalieren können, wahrscheinlich aber infolge der pathologisch veränderten Atmung erheblich weniger. Versuchstiere: 7 nicht vorbehandelte Meerschweinchen im Gewicht von 300—350 g. Analyse von dyspnoischen Zuständen, die sich während der Versuche entwickelten, unter Anwendung von N-Isopropylnoradrenalin. Feingewebliche Untersuchung der Lungen und Lebern aller Versuchstiere.

Schon bei der ersten Inhalation fiel bei mehreren Tieren die stark verlangsamte Atmung auf; bei einigen nahm sie asthmatoiden Charakter an. Husten nach dem ersten Versuch bei 3 von 7 Meerschweinchen. Reizsymptome seitens der Nasen- und Augenschleimhaut bei der Mehrzahl der Tiere geringer ausgeprägt als bei der Inhalation des Aerosols. Befreiungsversuche, Zittern, Zappeln und Kaubewegungen wie unter II beschrieben. Nach der 4. Inhalation treten bei einzelnen Tieren anfallsweise Zustände von asthmatoider Atmung erstmals außerhalb der Versuchsapparatur auf. Bleibende asthmatoide Atmung wurde bei einem Tier (nach der 7. Inhalation) gesehen, weitere Tiere folgten. Ein weiteres Tier wurde im Zustand der Dyspnoe nach der 8. Inhalation getötet. Ein Vergleichstier, zur selben Zeit getötet, ließ zwischen den Versuchen noch keine pathologische Atmung erkennen. Ein Tier starb 2 Tage nach der 9. Inhalation, 4 wurden nach der 10. Inhalation durch Nackenschlag getötet. 2 dieser Tiere hatten ständig asthmatoide Atmung.

Die Sektion der getöteten und der gestorbenen Tiere deckte bei allen ein Emphysem auf, dessen Ausprägung der Atemerschwerung etwa parallel ging. Weiterhin wurden kollabierte Bezirke in beiden Lungenspitzen, kleinere, meist sternförmige Einziehungen und kollabierte Partien auch in den tieferen Lungenteilen gefunden. Bei einzelnen etwa stecknadelkopfgroße, über die Oberfläche verstreute dunklere Punkte. An den sonstigen Organen kein auffallender Befund.

Die wiederholte Inhalation des Gemisches von Desmodur T-Dampf und Luft hatte demnach im wesentlichen die gleichen funktionellen

Folgen wie die wiederholte Inhalation eines desmodurhaltigen Aerosols. Die Krankheitserscheinungen entwickelten sich langsamer. Die Kollapsherde in der Lunge betrafen nur kleinere Bezirke. *Auch bei diesen Versuchen wurde die asthmatoide Atmung beobachtet. Sie trat anfangs und bei geringerer Desmodur-Schädigung anfallsweise auf, erst später entwickelte sich eine bleibende Dyspnoe.* Auch hier ließ sich durch Inhalation von N-Isopropylnoradrenalin nur eine partielle Normalisierung erreichen.

Histologische Untersuchung. In den Lungen finden sich kleinere herdförmige pneumonische und stellenweise emphysematöse Bezirke. Die pneumonischen Herde enthalten leukocytäres Exsudat mit ziemlich vielen histiocytären Zellen, die auch die Alveolarsepten und das übrige Zwischengewebe durchsetzen. Es besteht eine schwere eitrige Bronchitis mit Verlegung der Lichtung durch eitriges Exsudat, Verlust der Schleimhaut und entzündlicher Infiltration der Wand. Außerdem lassen sich vereinzelte eosinophile Leukocyten nachweisen. In kleineren Bronchiolen und Alveolargängen sieht man eigenartige Ausgüsse, die aus einem glasigrötlichen Material bestehen, in das offenbar erstarrte Teile der Schleimhaut eingelagert sind. Dabei sind Zellen und Kerne der Epithelien färberisch zum Teil gut darstellbar; andere weisen Pyknose und Chromatolyse auf. Auch bei diesen Versuchen sind Hyperplasien mit mehrschichtigem Zylinderepithel zu beobachten. Stellenweise sieht man Plattenepithelmetaplasien in den größeren Bronchien. Die tracheobronchialen Lymphknoten zeigen eine entzündliche Schwellung mit Keimzentrenbildung. An den Lebern keine besonderen pathologischen Veränderungen.

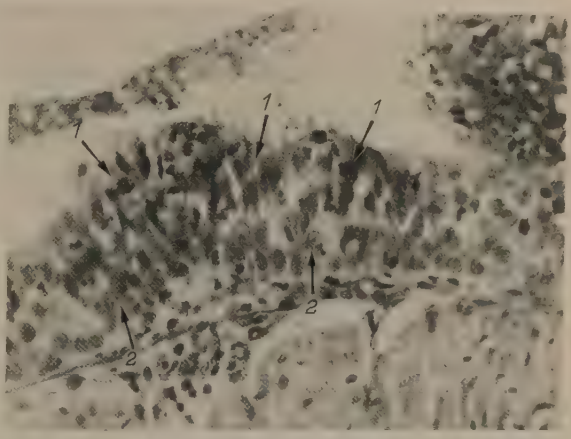


Abb. 8. Tier Nr. 451. Beginnende oberflächliche Schleimhautschädigung *1*, mit einzelnen Leukocyten. Erhaltene basale Schleimhautschicht *2*. Häm. Eosin, etwa 338fach

Die Befunde entsprechen im großen und ganzen den unter II beschriebenen. Es bestehen allerdings gewisse Unterschiede in der formalen Pathogenese. Bei der Einwirkung von Desmodur-Tröpfchen kommt es eher zu gröberen Schleimhautschäden; unter dem Einfluß des verdampften Stoffes zu mehr oberflächlichen Defekten (Abb. 8). Die durch Dampf bedingten Schäden finden sich vornehmlich im Bereich der

kleinsten Bronchialäste, deren dünnes einschichtiges Epithel schnell verloren geht. Größere Tröpfchen aus dem Aerosol sind demgegenüber in der Lage, auch im mehrschichtigen Epithel größerer Bronchien nachhaltige Schäden zu setzen. Allerdings ist eine Trennung dieser beiden Vorgänge vom histologischen Bild her später nicht mehr möglich, weil es durch die wiederholten Inhalationen von Dampf zu einer Summation kleiner Schäden auch in größeren Ästen kommt, die ein ähnliches Bild zeigen. Als Folge dieser Prozesse entsteht ein Granulationsgewebe in der Bronchialwand, das die kleineren Luftwege in jedem Falle, die größeren Luftröhrenäste bevorzugt nach Aerosolanwendung verlegt.

IV. Spätfolgen nach Desmodur T-Schädigung

7 Meerschweinchen, die einmal oder mehrmals Desmodur T-Aerosol inhaliert hatten, überlebten die letzte Inhalation 54—77 Tage. Eins von ihnen starb, die anderen wurden durch Nackenschlag getötet.

Zusammengefaßt ergeben sich bei diesen 7 Tieren gleichartige histologische Merkmale, wenn auch in verschieden starker Ausprägung. Es finden sich bronchitische Veränderungen, Peribronchitis und vorwiegend peribronchial gelegene Pneumonien. Bei mehreren Tieren ist es im Bereich entzündlicher Veränderungen zu eigenartigen Schleimhauthyperplasien gekommen. Völlig gesunde Lungen wurden selbst 77 Tage nach der letzten Inhalation nicht gefunden. Hervorzuheben ist, daß die besonderen Kennzeichen der frischen Desmodur-Schädigung, die nekrotisch gewordene und erstarrte Schleimhaut sowie die Entwicklung von Granulationsgewebe, nicht mehr nachweisbar waren. Die uncharakteristischen Folgen können die Desmodur-Einwirkung mehrere Monate überdauern und haben bei der Mehrzahl der Tiere eine geringe Heilungstendenz. Ein Spättodesfall wurde beobachtet.

Besprechung der Ergebnisse

Bei den eigenen Versuchen wurde gegenüber dem Vorgehen von Gross und Hellrung sowie von Fuchs und Valade Desmodur T kurzfristiger, aber wiederholt verabreicht. Erst die Summierung mehrerer kleiner, im einzelnen nicht lebensbedrohender Schäden ruft in der Regel Veränderungen in der Lunge hervor, welche die eigenartigen asthmatoiden Symptome bedingen.

Lösen sich die durch Desmodur zu Fremdkörpern gewordenen Schleimhautteile von der Unterlage ab, so entsteht eine ulceröse Bronchitis. Unterbleibt das Ablösen, so bildet sich ein aus der Wand vorwucherndes Granulationsgewebe, welches die nekrotischen Schleimhautstücke vor sich herschiebt, einschließt, und im weiteren Verlauf die Lichtung des erkrankten Bronchus vollständig ausfüllen kann. Das histologische Bild entspricht dann völlig einer Bronchiolitis obliterans. Offen-

bar stellt die durch Desmodur bedingte Nekrose einen besonderen Reiz für diesen Vorgang dar.

Die pathologisch-anatomischen Veränderungen erklären die klinischen Befunde. Als funktionelle Folgen der Desmodur-Einwirkung zeigten sich Reizerscheinungen mit Husten und Verengerung der Atemwege. Die reflektorische Verengerung der Luftröhrenäste war reversibel, wenn die Einwirkung von Desmodur die Beweglichkeit der Schleimhaut nicht beeinträchtigt hatte; sie wurde zur bleibenden Stenose, wo die Schleimhaut im kontrahierten Zustand erstarrte oder die Obliteration sich bereits in einem fortgeschrittenen Stadium befand. Ein derartig unterschiedliches Verhalten erklärt die vielgestaltige Symptomatik der Dyspnoe, sowohl die eigenartige Atmung mit stark verlangsamten, vertieften und unter Anspannung der Bauchmuskulatur durchgeführten Atemzügen, als auch Zustände von Luftnot, die an allergische Asthmaanfälle erinnerten. Da Anfälle von asthmatischer Dyspnoe in der Regel erst einige Zeit nach dem Abschluß der Desmodur-Inhalation auftraten, stark wirkende Broncholytica, die allergische Asthmaanfälle beim Meerschweinchen regelmäßig restlos beseitigen, hier kein völliges Verschwinden der Atemnot bewirkten und Atemkurven, wie sie für das allergische Asthma charakteristisch sind, bei diesen Tieren nicht erhalten wurden, handelte es sich nicht um eine pulmonale anaphylaktische Reaktion.

Soweit der Bronchialverschluß durch die Bronchiolitis obliterans nicht vollständig ist, kann er es doch leicht werden, wenn zusätzlich durch die Reizwirkung eine Kontraktion der Bronchialmuskulatur eintritt. Die Folgen sind Resorptionsatelektasen in den zugehörigen Lungenabschnitten, die außerordentlich häufig beobachtet werden konnten. Auf die gleiche Weise kann auch ein Ventilverschluß entstehen, so daß in diesem fortgeschrittenen Stadium regelmäßig ein Emphysem besteht.

In späteren Stadien bestimmen die sekundären Veränderungen in den Lungen mehr und mehr das Krankheitsbild: in erster Linie massive Pneumonien vorwiegend eitriger Natur, verschiedentlich auch Vermehrung histiocytärer Zellen im Bereich der Alveolarsepten. Die schweren, entzündlichen Prozesse dürften durch sekundäre Infektion bedingt sein. Die Tiere starben dann nach Wochen oder Monaten an Herzversagen oder Kachexie. Derartige Spättodesfälle wurden auch von Gross und Hellrung beobachtet.

Normale Bronchialschleimhaut und gesundes Alveolargewebe des Meerschweinchens sind im allgemeinen zu hohen Abwehrleistungen gegenüber inhalierten Bakterien befähigt. 48 Stunden nach der 10 min dauernden Inhalation einer 24-Stunden-Kultur von virulenten hämolysierenden Streptokokken in Fleischwasser-Bouillon (37°) ist der anfänglich stark erhöhte Keimgehalt der Lungen wieder auf normale Werte abgefallen (Friebel, Basold und Halbeisen). Diese Selbstreinigung wird durch die Inhalation von permeabilitätssteigernden Stoffen (Hyaluronidase, Histamin) bereits erheblich gestört (ibid.). Man darf daher annehmen, daß es durch

die Desmodur-Schädigung auch zu einem Versagen dieser Funktion und damit zur Ausbreitung bakteriell bedingter Bronchitiden und Pneumonien kommt.

Entsprechende Funktionsstörungen sind in der Regel auch für die Desmodur-Schädigung des Menschen anzunehmen. Über die Desmodurmengen bzw. -konzentrationen, die beim Menschen zur Schädigung der Lunge führen, ist unseres Wissens nichts Sicheres bekannt. Immerhin werden bei der Spritzlackierung geschlossener oder halboffener Behälter ähnliche Verhältnisse wie in unseren Aerosolkammern entstehen können. Das zeigt z. B. der Unfall, den E. L. als Ofenheizer in einer Desmodur-Lagerhalle erlitt (Ganz und Mager).

Bei der Einwirkung größerer Desmodurmengen bzw. stärkerer -konzentrationen treten schon nach kurzer Zeit Tränen, Hustenreiz (Reinl) und Rhinitis (Fall H. L., Akten der Berufsgenossenschaft Chemischer Industrie, Köln) auf, Reizsymptome, die auch beim Meerschweinchen beobachtet wurden. In den von Ganz und Mager beschriebenen Fällen entwickelte sich ein Krankheitsbild, das vom praktischen Arzt zunächst als Lungenödem angesehen wurde (Akten der Berufsgenossenschaft). Lungenödem haben auch Gross und Hellrung, die ihren Tieren größere Desmodurmengen als wir gaben, beobachtet. Der erste Anfall von Dyspnoe tritt beim Menschen gewöhnlich erst nach mehrtägiger Beschäftigung in desmodurhaltiger Atmosphäre oder bei erneuter Berührung nach einer Arbeitspause auf. Dementsprechendes Verhalten wurde bei den Meerschweinchen beobachtet. Vereinzelt kam es beim Menschen ähnlich wie bei unseren Meerschweinchen schon im Zusammenhang mit der ersten Desmodur-Inhalation zu asthmatoiden Zuständen (z. B. bei einem von Schürmann vor dem Allergieausschuß der Werksärztlichen Arbeitsgemeinschaft vorgetragenen Krankheitsfall eines Süßmosterei-Inhabers). Die Dyspnoe der von Ganz und Mager untersuchten Moltoprenarbeiter reagierte häufig auf Broncholytica nur vorübergehend günstig. Bei E. L. kam es einige Stunden nach der Asthmolysin-Anwendung zu erneuter Atemnot, obwohl keine weitere Desmodur-Inhalation stattgefunden hatte. Dasselbe kann man auch bei Meerschweinchen beobachten. — Nach akuter Desmodur-Intoxikation wird von den Patienten schmerzhaftes, wundes Gefühl bei der Atmung angegeben (Fall E. H.). Das erinnert an die Befunde der von der Submucosa abgelösten Schleimhaut, wie wir sie beim Meerschweinchen sahen. Moltoprenarbeiter wurden einige Tage nach Beginn ihrer Erkrankung durchleuchtet. Soweit Veränderungen nachgewiesen wurden, handelte es sich um Bronchitis und Peribronchitis, im Falle E. L. um fragliche bronchopneumonische Herde. Gleichartige Befunde wurden auch bei einem Anstreicher W. K., einem Aufsichtsbeamten in einem Moltoprenbetrieb und anderen erhoben (Akten der Berufsgenossenschaft). Bronchitis, Peribronchitis und bronchopneumonische Herde sind ein regelmäßiger Befund bei den Tierversuchen.

Der weitere Verlauf der Desmodur-Erkrankung beim Menschen kann zur Ausheilung oder zu Siechtum und Spättodesfällen führen. Der Arbeiter H. B. z. B. starb 8 Jahre nach einer schweren Desmodur-Intoxikation an asthmatoider Bronchitis, Herzversagen bei hochgradigem Emphysem und Desquamativ-Katarrh in den Bronchien (Akten der Berufsgenossenschaft). Bei Meerschweinchen fanden wir ebenfalls sowohl leichtere als auch weniger günstige Verlaufsformen. Auch hier wurden bei den Spättodesfällen Bronchitis, herdförmige Pneumonie, Emphysem, Herzversagen nachgewiesen. Sowohl beim Tier als auch beim Menschen kommt es bei annähernd gleicher Desmodur-Aufnahme zu unterschiedlichen Krankheitsverläufen. Eine besondere Gefährdung von Tieren, die vor den Desmodur-Versuchen bereits allergische Asthmaanfälle durchgemacht hatten, konnte nicht nachgewiesen werden

Die Beispiele zeigen, daß es zahlreiche Übereinstimmungen bei Mensch und Tier gibt, während grundlegende Unterschiede bisher nicht nachgewiesen wurden. Verständlicherweise fehlen histologische Befunde von *frischen Desmodur-Schäden in menschlichen Lungen*, die das wesentlichste Ergebnis unserer tierexperimentellen Untersuchungen, die Fremdkörper- und Granulombildung, auch für den Menschen bestätigen.

Bis jetzt sind die funktionellen Folgen der Desmodur-Einwirkung auf den *Menschen* vorwiegend als allergische Reaktionen gedeutet worden (Akten d. Berufsgenossenschaft; Jahresbericht der Gewerbeaufsicht 1952 NrW 81; Reinl u. a.). Asthmatoide Zustände können aber schon nach der ersten Desmodur-Inhalation auftreten (z. B. in dem von Schürmann genannten Fall). Hier ist eine vorausgehende Sensibilisierung und Antikörperbildung ausgeschlossen. Außerdem scheint der Anstieg der Eosinophilen im Blut, auf den in den Angaben der Gewerbeärzte und von Reinl u. a. mehrfach hingewiesen wird, in keinem Fall besonders eindrucksvoll gewesen zu sein (7—9%). Für das Bestehen einer Desmodur-Allergie ist er nicht beweisend. Der Zerfall von Bronchialepithel und Alveolargewebe ist Grund genug für Abwehrreaktionen mit mäßiger eosinophiler Zellvermehrung. In Anbetracht der von uns nachgewiesenen pathohistologischen Veränderungen wird man wohl zunächst an toxische Veränderungen denken. Allergie kann allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Die völlige Klärung dieser Frage wird dadurch erschwert, daß ein zuverlässiger Nachweis der Antigen-Antikörperreaktion kaum möglich ist. Die starke Affinität von Desmodur T zu Eiweiß stellt ein ernsthaftes Hindernis für die Durchführung der Prausnitz-Küstnerschen Reaktion dar. Der Beweis einer Sensibilisierung durch Desmodur bereitet selbst in Fällen von klinisch wahrscheinlicher Allergie große Schwierigkeiten, denn die Resorption von Bakterien, von bakteriellen Stoffwechselprodukten und von zerfallenem Gewebe ermöglicht eine Sensibilisierung gegen *alle* in den Atemwegen befindlichen körperfremden und körperfremd gewordenen Stoffe, wie es auch nach jeder banalen Pneumonie möglich ist.

Bei unseren *Meerschweinchen* wurden Anfälle von echtem allergischem Asthma *nicht* beobachtet. Anhäufungen von Eosinophilen ließen sich nur vereinzelt nachweisen, während sie bei Asthma-Meerschweinchen, die gegen Hühnereiweiß sensibilisiert sind, regelmäßig im peribronchialen und perivasculären Gewebe auftreten (Friebel). Die hier beschriebenen Krankheitszustände sind ohne Zweifel die Folge der chemischen Reaktion von Desmodur mit dem Bronchialepithel. Diese Reaktion kommt bereits beim *ersten* Kontakt zustande und bedingt ein Absterben der betroffenen Zellen. Mit dieser Feststellung ist die anfangs gestellte Frage nach der Grundlage der Desmodur-Schädigung beantwortet. *Es handelt sich somit eindeutig um einen primär toxischen Vorgang.*

Zusammenfassung

An 47 Meerschweinchen wurde untersucht, welche Wirkung injiziertes und inhaliertes Desmodur T auf die Atemwege ausübt. 3 Tieren wurde Desmodur intratracheal injiziert. Die übrigen inhalierten Desmodur wiederholt 10 oder 20 min lang in Aerosolform oder als Dampf.

Beim Kontakt des Bronchialgewebes mit Desmodur kommt es zu einer chemischen Reaktion, die ein rasches Absterben der unmittelbar betroffenen Zellen zur Folge hat. Auf diese Weise zu „Fremdkörpern" gewordene Schleimhautteile rufen entzündliche Gewebsneubildungen hervor. Anfängliche vorübergehende Zustände von Atemnot können im weiteren Verlauf in eine chronische Dyspnose übergehen. Als Ursache kommen Bronchialspasmen infolge toxischer Reizung oder eine vorübergehende, dauernde, partielle oder vollständige Verlegung der Atemwege durch leukocytäres Exsudat oder Granulationsgewebe in Frage.

Eine Regeneration des abgestorbenen Epithels ist möglich. Bronchitis und pneumonische Prozesse können ausheilen. Nach einer schweren Schädigung kann sich aber ein chronischer Krankheitszustand entwickeln, bei dem die Desmodur-Einwirkung die auslösende Ursache war, während der weitere Verlauf ausschließlich durch die Folgekrankheiten charakterisiert wird. Spättodesfälle als Folge der langdauernden eitrigen Infektionen können noch nach Wochen und Monaten auftreten.

Die Symptome und der Verlauf der Desmodur-Schädigung beim Meerschweinchen stimmen mit Beobachtungen an desmodurgeschädigten Menschen weitgehend überein.

Fräulein Edith Brinkmann, Annelore Schmidt und Marianne Kritzler-Kosch danken wir für die wertvolle Mitarbeit, den Farbwerken „Bayer" Leverkusen für die Förderung der Untersuchungen.

Literatur

Bayer, O.: Angew. Chem. A, **59**, 257 (1947). — Flury, F., u. W. Wirth: Arch. Gewerbepath., Berlin **5**, 1 (1953). — Friebel, H.: Internat. Arch. Allergy. a. appl. Immunol. **5**, 401 (1954). — Friebel, H., u. A. Basold: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 13 (1953). — Friebel, H., A. Basold u. Th. Halbeisen: Z. Hygiene **135**, 536 (1952). — Fuchs, S., et P. Valade: Arch. mal. profess. méd., Paris **12**, 191 (1951). — Ganz, H., u. E. Mager: Zbl. Arbeitsmed. u. Arbeitsschutz **4**, 42 (1954). — Gross, E., u. Hellrung: Unveröffentl. Versuche. — Reinl, W.: Zbl. Arbeitsmed. u. Arbeitsschutz **3**, 103 (1953). — Swensson, A., C. Holmquist and K. Lundgren: Brit. J. Industr. Med. **12**, 50 (1955).

Doz. Dr. H. Friebel, Bonn, Reuterstr. 2b, Pharmakologisches Institut, und Doz. Dr. H. Lüchtrath, Bonn, Venusberg, Pathologisches Institut

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 111—122 (1955)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Eichholtz)

Über die Wirkung von k-Strophanthin am Herz-Lungen-Präparat der Ratte und des Meerschweinchens

Von
M. v. Bubnoff, J. Krieg und H. Amiri

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. August 1955)

Die auffallend hohe Resistenz der Ratte gegenüber Digitalisglykosiden ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen. Mangels geeigneter Methoden wurde jedoch bisher die Empfindlichkeit des Rattenherzens hauptsächlich auf Grund von toxischen Erscheinungen beurteilt, so daß über therapeutische Wirkungen keine zuverlässigen Angaben vorliegen. Bei Versuchen am Herzstreifenpräparat der Ratte führte zwar die Verabreichung von Strophanthin zu einer Verstärkung der Kontraktionen des ermüdeten Herzmuskels (Masuoka u. Saunders; Reiter); doch sind die Bedingungen hierbei sehr wenig physiologisch.

Mit dem kürzlich von Begovič u. Stern beschriebenen Herz-Lungen-Präparat (HLP) der Ratte war nun die Möglichkeit gegeben, auch therapeutische Effekte von Digitalisglykosiden zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit befaßt sich daher mit der Frage, ob überhaupt am insuffizienten Rattenherzen eine therapeutische Wirkung von Strophanthin nachzuweisen ist; anschließend sollte versucht werden, die therapeutische Breite am Rattenherzen zu bestimmen und in Beziehung zu anderen Tierarten zu setzen. Zu diesem Zweck wurde in einigen vergleichenden Versuchen auch die Wirkung von Strophanthin am HLP des Meerschweinchens geprüft.

Das Studium etwaiger therapeutischer Wirkungen war vielleicht geeignet, einen Beitrag zur weiteren Aufklärung der auffallenden Resistenz des Rattenherzens gegenüber Strophanthin zu liefern. Über die Ursachen dieser Resistenz besteht nämlich keine einheitliche Meinung. Clark war der Auffassung, der Grund für diese Unterempfindlichkeit liege in einer mangelhaften Bindungsfähigkeit des Rattenherzens. Dementsprechend zeigte Genuit, daß das isolierte Rattenherz höchstens 20—30% der zugeführten toxischen Strophanthinmenge zu speichern vermag, also bei weitem nicht das Bindungsvermögen des Katzenherzens erreicht (vgl. Weese). Ein Vergleich der Verteilungsverhältnisse ergab jedoch, daß Rattenherzen ebenso wie Meerschweinchen- und Katzenherzen 10% der dem Ganztier injizierten letalen

Dosis festhalten (Genuit, Weese). So konnten als Erklärung der Unterempfindlichkeit der Ratte auch Hinweise auf eine bevorzugte Ablagerung bzw. Zerstörung in anderen Organen als dem Herzen (vgl. Hatcher; Hatcher u. Eggleston; Farah; Bine u. Mitarb.) nicht befriedigen. Straub gab an, daß Rattenblut in der Lage sei, 40—50% des zugeführten Strophanthins zu zerstören. Farah konnte diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigen. Gunn war der Meinung, das Herz selbst sei für diese Unterempfindlichkeit verantwortlich zu machen.

Von Hoffmann u. Wienke wurde neuerdings auf eine interessante Tatsache hingewiesen: Sie fanden eine Abhängigkeit der tödlichen Dosis von der den jeweiligen Tierarten eigenen Herzfrequenz; letztere ist bei jeder Tierart abhängig vom Herzgewicht bzw. dem Durchmesser der Herzmuskelfaser (Harrison; Boros). Die Dosis letalis minima ist nun direkt proportional der Frequenz und der Zellzahl pro Raumeinheit, umgekehrt proportional dem Zelldurchmesser und dem Herzgewicht. Beim Rattenherzen mit seiner großen Zellzahl liegt danach die tödliche Dosis höher als bei anderen Tierarten, die Wirkung tritt schneller ein, andererseits ist auch die Kumulationsneigung geringer. Auch Sjoerdsma u. Fischer beobachteten, daß vom Rattenherzen radioaktives Digitoxin bei weitem weniger lang festgehalten wurde als vom Katzenherzen.

Versuchsanordnung

Wir verwendeten Ratten und Meerschweinchen im Gewicht von 200—280 g. Präparation und Narkose erfolgten mit geringfügigen Modifikationen nach den Angaben von Begovič u. Stern. Zusätzlich führten wir zur Messung des re. Vorhofdrucks eine Glaskanüle in die V. cava cranialis dextra ein.

Von der Aorta aus führte ein Gummischlauch über ein Widerstandsgefäß zum bubble-flow-meter. Von dort wurde das Blut über ein doppelwandiges, in der Vertikalen verschiebbares Vorratsgefäß zur unteren Hohlvene zurückgeleitet. Zwischen Aortenkanüle und Widerstandsgefäß war im Nebenschluß ein Quecksilbermanometer zur Messung des Aortendrucks eingeschaltet. Das Widerstandsgefäß bestand aus einem Glaszylinder mit einer seitlichen Zuführung. In dem Glaszylinder war ein beidseitig offener Gummifingerling befestigt, der über die seitliche Zuführung von außen her unter beliebigen, an einem 2. Hg-Manometer ablesbaren Druck gesetzt werden konnte. Die vom Herzen ausgeworfene Blutmenge wurde mit dem bubble-flow-meter (Braun, Althoff u. Taugner) gemessen und mit dem Ordinatenschreiber von Jaquet bzw. von Braun-Melsungen registriert. Der re. Vorhofdruck wurde über die V. cava cranialis dextra mittels Wassermanometer gemessen. Der Schwimmer des Manometers bestand aus paraffiniertem Kork.

Das Blut[1] wurde sowohl im Vorratsgefäß als auch unmittelbar vor der Einmündung in die V. cava caudalis durch einen Thermostaten aufgewärmt. Die zur Auffüllung des Systems erforderliche Blutmenge (20—25 cc Blut + 5 cc NaCl) wurde vor Versuchsbeginn in das Vorratsgefäß eingefüllt. Das Verbindungsstück zur caudalen Hohlvene war bis zum Ende der Präparation abgeklemmt. Zur Auffüllung des Systems war das Blut von 2—3 Ratten bzw. Meerschweinchen erforderlich. Aus Sparsamkeitsgründen versuchten wir, mit Katzen-, Schweine- und Ochsenblut zu arbeiten. Ochsenblut erwies sich als unbrauchbar (starke hämorrhagische Infarzierung der Lungen schon kurz nach Versuchsbeginn). Schweineblut war dagegen gut zu verwenden; die Resultate waren etwa die gleichen wie mit Rattenblut. Katzenblut kam in den vorliegenden Versuchen nicht zur Verwendung, ist aber prinzipiell ebenfalls brauchbar.

[1] Zur Gerinnungsverhütung wurde Thrombocid verwendet, für dessen Überlassung wir der Firma Dr. W. Benend, München, danken.

Die Zuführung von k-Strophanthin[1] erfolgte meist durch Dauerinfusion in das Vorratsgefäß, in einigen Fällen in Form von tropfenweiser Verabreichung mit der Tuberkulinspritze.

Versuchsergebnisse

Die therapeutische Wirkung eines Digitalisglykosids ist entscheidend abhängig vom Zustand des Herzens im Augenblick der Injektion. Strophanthin hat am suffizienten Herzen keine Wirkung. Ist aber die Arterialisation durch Lungenödem schlecht geworden, was bei spontaner Insuffizienz am HLP häufig der Fall ist, so versagt ebenfalls die therapeutische Wirkung von Strophanthin (Anitschkoff u. Trendelenburg; vgl. auch Kisch u. Schwarz). Auch in unseren Versuchen trat bei längerer Versuchsdauer häufig ein Lungenödem auf. Da in vielen Fällen aber bis zu diesem Zeitpunkt die Herzleistung noch nicht beeinträchtigt war, erschien es zweckmäßig, das Eintreten der Insuffizienz durch mechanische Belastung oder durch Vergiftung zu beschleunigen.

Belastung des linken Herzens durch starke Erhöhung des arteriellen Gegendrucks führte gleichzeitig mit der akut eintretenden Linksinsuffizienz zu einem massiven Lungenödem. Auch eine maximale Belastung des rechten Herzens durch dauernde Einstellung des venösen Reservoirs auf eine Höhe von 25—30 cm H_2O erwies sich nicht als zweckmäßig. Der arterielle Gegendruck wurde daher auf 50—80 mm Hg, der Spiegel des venösen Vorratsgefäßes auf eine relativ geringe Grundhöhe von 12—15 cm eingestellt. Wir erhöhten dann in Abständen von 2 bis 5 min den Spiegel stufenweise um je 5 cm bis zu einer Gesamthöhe von 25 cm (1. und 2. Belastungsstufe), gingen anschließend wieder zur Grundhöhe zurück, belasteten wieder usw. Diese intermittierende Belastung konnte gleichzeitig an Hand des Venendrucks als Maßstab für die Leistungsfähigkeit des Herzens verwendet werden (Abb. 1, 3).

Das suffiziente Herz reagiert auf eine solche Erhöhung des Blutangebots mit einer Zunahme des Minutenvolumens (hauptsächlich durch Vergrößerung des Schlagvolumens) bei geringem Anstieg des rechten Vorhofdrucks (Patterson u. Starling; Krayer). Beim geschädigten Herzen dagegen bewirkt vermehrter Zufluß eine starke Erhöhung des Vorhofdrucks; das Minutenvolumen nimmt nur wenig oder überhaupt nicht zu („relative Suffizienz", Krayer). Allerdings muß berücksichtigt werden, daß bei einer starken Erniedrigung der Frequenz unter erhöhter Füllung des Herzens ebenfalls der Vorhofdruck ansteigen kann.

Am HLP der *Ratte* war bei mäßiger Belastung in 11 von 14 Versuchen nach 25—50 min eine kompensierte Insuffizienz erreicht: Erhöhung des Blutangebots verursachte einen erheblichen Anstieg des rechten Vorhofdrucks bei geringer oder fehlender Zunahme der Förderleistung. Dementsprechend war der Vorhofdruck bei der 1. und 2. Belastungsstufe wesentlich höher als zu Versuchsbeginn; Minuten- und Schlagvolumen

[1] Für die Überlassung von Kombetin sind wir der Firma C. F. Boehringer, Mannheim, sehr zu Dank verpflichtet.

hatten im Vergleich zu den Ausgangswerten abgenommen; die Frequenz war im Mittel um 7% abgefallen (Abb. 2a, Tab. 1). Der größeren Übersichtlichkeit halber sind in diesen Darstellungen nur die entsprechenden Werte der 2. Belastungsstufe aufgeführt[1].

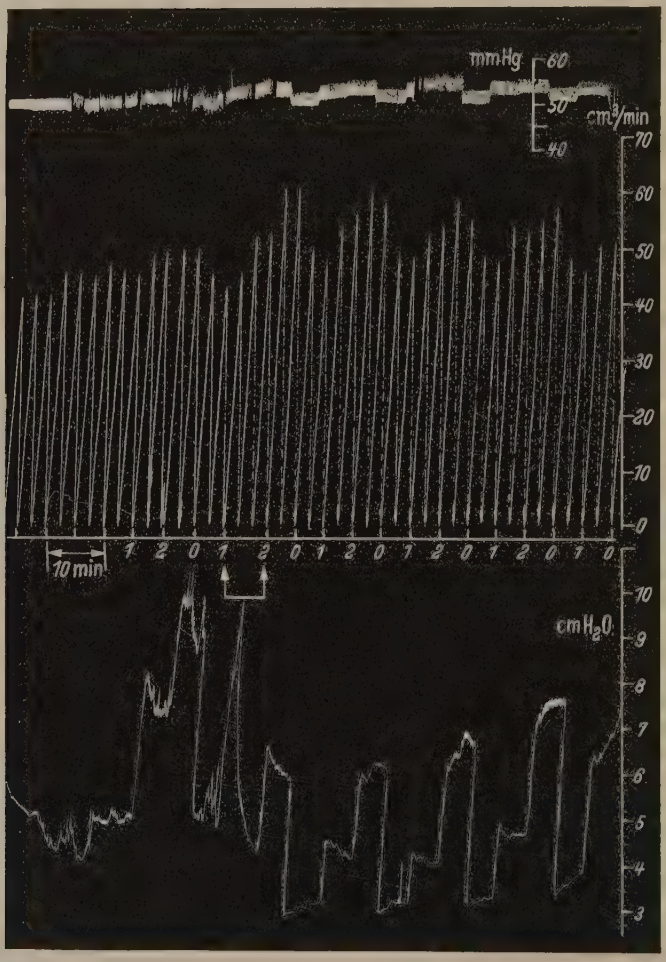


Abb. 1. Wirkung von k-Strophanthin am HLP der Ratte bei Spontaninsuffizienz. Oben: Aortendruck. Mitte: Minutenvolumen. Anstieg der Kurve bedeutet Verbesserung des Minutenvolumens. Unten: Re. Vorhofdruck. Ausgangshöhe des venösen Reservoirs: 15 cm (= 0); 1 = Erhöhung des venösen Vorratsgefäßes auf 20 cm, 2 = Erhöhung auf 25 cm. ↑ ↑ = Infusion von 190 γ k-Strophanthin in 7 min in das Vorratsgefäß. — Nähere Erläuterung siehe Text

[1] Bei 3 Versuchen fehlen die entsprechenden Anfangswerte; in diesen Fällen war schon bei der ersten Belastungsprüfung eine Insuffizienz zu erkennen; daraufhin wurde sofort Strophanthin verabreicht (vgl. Abb. 1).

Die Verabreichung von Strophanthin führte zu diesem Zeitpunkt regelmäßig zu einem Druckabfall im rechten Vorhof und einem Anstieg des Minuten- und Schlagvolumens bei gleichbleibender Frequenz. Der Vorhofdruck erreichte im weiteren Verlauf der Strophanthininfusion in den meisten Fällen wieder den zu Versuchsbeginn registrierten Ausgangswert; das Schlagvolumen stieg besonders bei vorangegangener Frequenzabnahme noch über diesen hinaus an, so daß in allen Versuchen auch das Minutenvolumen wieder den vor der Insuffizienz gemessenen Wert erreichte (Abb. 2a, Tab. 1). Die Wirkung von Strophanthin setzte im Mittel bei 87,5 γ (höchster Wert 150, niedrigster 50 γ), entsprechend 81,1 γ/g Herz, ein. Der Höhepunkt der Strophanthinwirkung war nach Infusion von 100—300 γ erreicht. In 8 Versuchen wurde die letale Dosis bestimmt. Diese lag im Mittel bei 1762,5 γ (1250—2750 γ) entspr. 1635 γ/g Herz. Die Zeit vom Beginn der Strophanthininfusion bis zum Herzstillstand betrug 25—50 min.

Bei dem in Abb. 1 abgebildeten Versuch (Nr. 32, Tab. 1) ließ schon die 25 min nach Versuchsbeginn durchgeführte Belastungsprüfung eine Schädigung des Herzens erkennen: Bereits mit der ersten Belastungsstufe war die Suffizienzgrenze erreicht. Unmittelbar nach Beginn der Strophanthininfusion wurde der Spiegel des venösen Vorratsgefäßes erneut von 15 auf 20 cm (1. Belastungsstufe) erhöht; der rechte Vorhofdruck stieg daraufhin zunächst auf 10 cm an, dann setzte die Strophanthinwirkung ein (nach etwa 90 γ), erkennbar am Abfall des Vorhofdrucks auf 4,4 cm; bei der darauffolgenden 2. Belastungsstufe wurde die Verbesserung der Herzleistung noch deutlicher, die Suffizienzgrenze des Herzens war nach oben gerückt. Ein Vergleich der nächsten 3 Stufen mit den entsprechenden Daten des insuffizienten Herzens ergibt folgende Werte:

	Vorhofdruck (cm H_2O)			Minutenvolumen (cm^3/min)			Schlagvolumen (cm^3)			Frequenz /min		
	15 cm	20 cm	25 cm	15 cm	20 cm	25 cm	15 cm	20 cm	25 cm	15 cm	20 cm	25 cm
Insuffizienz	5,1	7,5	9,9	44,5	48,0	49,0	0,223	0,235	0,236	200	204	208
nach Strophantin	3,1	4,4	6,2	47,5	55,0	60,0	0,233	0,260	0,284	204	212	212

Nach insgesamt 190 γ wurde die Strophanthininfusion abgebrochen. Im weiteren Versuchsverlauf stieg der Vorhofdruck in allen 3 Stufen allmählich wieder an.

Bei 3 Tieren war die Verabreichung von Strophanthin ohne therapeutischen Effekt; wahrscheinlich waren bei diesen Versuchen die oben erwähnten Vorbedingungen noch nicht erfüllt. — Bei weiteren 15 Versuchen waren die Verhältnisse durch frühzeitig eingetretenes Lungenödem kompliziert, so daß die Strophanthinwirkung nicht zuverlässig beurteilt werden konnte.

Zur toxischen Schädigung des Herzens wählten wir in 12 besonderen Versuchen Somnifen[1]. Stieg der Venendruck nach der Somnifeninjektion nicht deutlich an, so wurde der venöse Zufluß zur Prüfung der Suffizienzgrenze des betr. Herzens ebenfalls stufenweise verändert. Bis zu 20 mg Somnifen waren ohne Wirkung. Bei höherer Dosierung stieg zwar der Vorhofdruck an bei gleichzeitiger Verminderung des Minutenvolumens; diese Veränderungen waren jedoch regelmäßig von einer ausgeprägten Bradykardie und einer Vergrößerung des Schlagvolumens begleitet (vgl. Abb. 2b). Häufig kam kurze Zeit darauf ein Lungenödem hinzu. Die Somnifenwirkung war auswaschbar: Ersetzten wir bei einem mit Somnifen vergifteten Herzen das zirkulierende Blut durch frisches Blut, so fiel der Vorhofdruck wieder ab, Minutenvolumen und Frequenz nahmen zu.

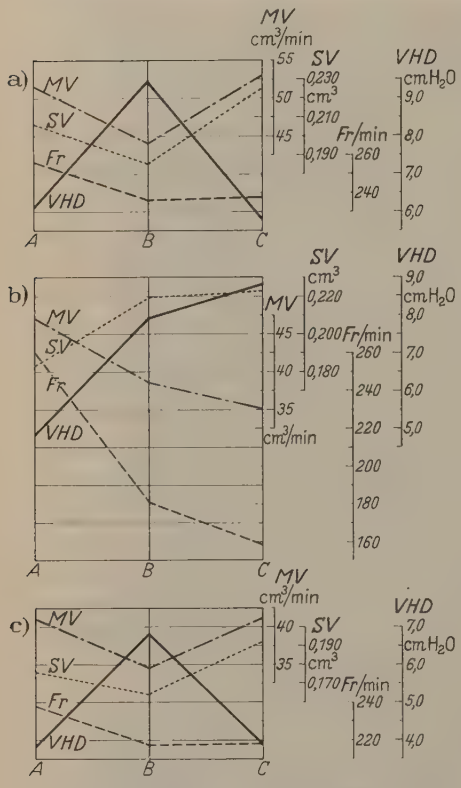


Abb. 2. Mittelwert von Minutenvolumen (*MV*), Schlagvolumen (*SV*), Herzfrequenz (*Fr*) und re. Vorhofdruck (*VHD*) zu Versuchsbeginn (*A*), bei Insuffizienz (*B*) und nach Strophanthin (*C*). a) Ratte, Spontaninsuffizienz (8 Versuche); b) Ratte, Somnifeninsuffizienz (10 Versuche); c) Meerschweinchen, Spontaninsuffizienz (2 Versuche) und Somnifeninsuffizienz (5 Versuche). — Die Unterschiede am re. Vorhofdruck sind statistisch signifikant

Die mit Somnifen vergifteten Präparate waren mit Strophanthin therapeutisch nicht zu beeinflussen; die Somnifenwirkung nahm während der Strophanthininfusion weiterhin zu.

Zum Vergleich prüften wir im Anschluß an diese Versuche die Wirkung von Strophanthin am HLP des *Meerschweinchens*. Auch hier war bei längerer Versuchsdauer u. U. ein Lungenödem zu erwarten und daher die Notwendigkeit gegeben, die Versuche innerhalb 60—90 min zu beenden. Da nur in 2 Fällen schon kurz nach Versuchsbeginn eine Spontaninsuffizienz vorhanden war, wurde bei 5 Tieren nach der ersten Belastungsprüfung Somnifen injiziert. Die Wirkung von Somnifen setzte im Gegensatz zur Ratte schon nach Verabreichung von 4—16 mg ein: Der Vorhofdruck stieg an, Minuten- und Schlagvolumen fielen ab, ebenso die Frequenz (Abb. 2c). Die Bradykardie erreichte jedoch bei weitem nicht das bei den Rattenversuchen beobachtete Ausmaß.

[1] Somnifen (Diäthylbarbitursäure + Allylisopropylbarbitursäure) wurde uns freundlicherweise von der Firma Deutsche Hoffmann-La Roche AG., Grenzach/Baden, zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1. *Wirkung von Strophanthin am HLP der Ratte*

Die angeführten Werte beziehen sich jeweils auf die höchste Belastungsstufe. a = anfangs, i = Insuffizienz, Str = nach Strophanthin

Versuch Nr.	Minutenvolumen (cm^3/min)			Schlagvolumen (cm^3)			Venendruck (cm H_2O)			Frequenz /min			therapeut. Dosis (γ)	letale Dosis (γ)
	a	i	Str	a	i	Str	a	i	Str	a	i	Str		
6	67,0	58,0	67,0	0,305	0,277	0,305	7,8	11,1	6,9	220	210	220	75	—
7	64,0	58,0	71,0	0,292	0,262	0,317	5,6	9,5	5,9	220	222	224	50	—
8	—	52,5	63,0	—	0,238	0,297	—	10,5	7,8	—	220	212	75	2750
22	37,0	14,0	37,0	0,154	0,073	0,168	4,8	9,4	3,4	240	192	220	100	2100
26	38,5	37,0	45,0	0,175	0,168	0,205	6,6	9,2	7,4	220	220	220	150	1375
31	56,0	51,0	54,0	0,233	0,213	0,233	6,0	11,2	6,1	240	240	232	75	1300
32	—	49,0	60,0	—	0,236	0,284	—	9,9	6,2	—	208	212	90	—
34	—	30,5	42,0	—	0,109	0,148	—	11,1	7,3	—	280	284	50	1250
39	62,5	51,5	58,5	0,164	0,171	0,195	6,0	8,7	5,4	380	300	300	50	1300
40	42,0	42,0	45,0	0,162	0,169	0,195	5,3	7,2	5,6	260	248	232	125	1800
46	44,0	38,5	45,0	0,162	0,148	0,179	7,0	9,0	5,6	272	260	252	75	2225

Tabelle 2. *Wirkung von Strophanthin am HLP des Meerschweinchens*

Die angeführten Werte beziehen sich jeweils auf die höchste Belastungsstufe. a = anfangs, i = Insuffizienz, Str = nach Strophanthin

Versuch Nr.	Minutenvolumen (cm^3/min)			Schlagvolumen (cm^3)			Venendruck (cm H_2O)			Frequenz /min			therapeut. Dosis (γ)	letale Dosis (γ)
	a	i	Str	a	i	Str	a	i	Str	a	i	Str		
3	48,0	42,0	45,0	0,218	0,210	0,225	3,1	4,8	3,2	220	200	200	25	112
6	42,0	41,0	42,0	0,210	0,190	0,215	3,3	5,0	3,5	200	216	196	13	80
8	45,0	35,0	45,0	0,146	0,122	0,154	3,8	8,0	3,1	308	288	292	6	48
11	48,0	36,0	47,0	0,208	0,180	0,225	3,6	7,9	3,7	232	200	208	15	125
12	48,0	40,0	48,0	0,178	0,185	0,207	4,2	7,4	4,2	268	216	232	6	91
13	21,0	19,0	23,0	0,089	0,079	0,096	3,8	4,8	3,3	236	240	240	12,5	40
14	36,0	29,0	36,0	0,180	0,181	0,225	4,9	9,7	6,6	200	160	160	6	85

Strophanthin führte in allen Versuchen zu einer Verbesserung der Herzleistung; Vorhofdruck und Minutenvolumen hatten bei der nächsten Belastungsprüfung wieder die vor der Insuffizienz gemessenen Werte

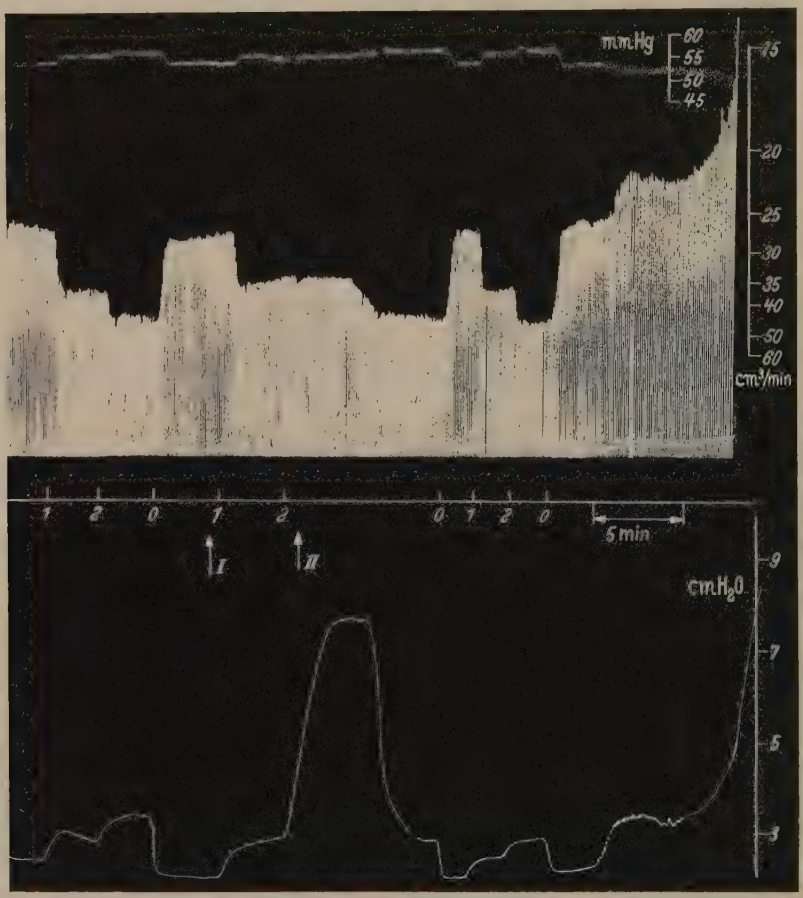


Abb. 3. (Versuch Nr. 8, Tab. 2.) Wirkung von k-Strophanthin am HLP des Meerschweinchens bei Somnifeninsuffizienz. Oben: Aortendruck. Mitte: Minutenvolumen. Abfall der Kurve bedeutet Verbesserung des Minutenvolumens. Unten: Re. Vorhofdruck. Ausgangshöhe des venösen Reservoirs: 15 cm (= 0); 1 = Erhöhung des venösen Vorratsgefäßes auf 20 cm, 2 = Erhöhung auf 25 cm. $\uparrow_I$ = Injektion von 4 mg Somnifen; $\uparrow_{II}$ = Beginn einer Dauerinfusion von 2 γ k-Strophanthin/min: Wirkungseintritt nach 3 min (erkennbar am Abfall des Vorhofdrucks bei gleichzeitiger Zunahme des Minutenvolumens), Herzstillstand nach 24 min

erreicht, das Schlagvolumen war auf einen die Frequenzverlangsamung kompensierenden höheren Betrag angestiegen (Abb. 2c). Die Strophanthinwirkung setzte im Mittel der 7 Versuche bei 11,9 γ (6—25 γ), entspr. 11,4 γ/g Herz, ein; die letale Dosis lag bei 83 γ (40—125 γ) entspr. 79,9 γ/g Herz.

Besprechung der Ergebnisse

Ein Vergleich der von uns an Ratte und Meerschweinchen gemessenen Minutenvolumina mit den entsprechenden Werten am HLP von Hund und Katze ergab, auf das Herzgewicht bezogen, befriedigende Übereinstimmung (vgl. PATTERSON u. STARLING; KNOWLTON u. STARLING). Da außerdem das HLP von Ratte und Meerschweinchen den STARLINGschen Gesetzen folgt, schien es erlaubt, zur Bestimmung der Suffizienzgrenze die von KRAYER u. a. für das HLP des Hundes angegebenen Kriterien zu verwenden.

Eine gewisse Schwierigkeit bestand bei unseren Versuchen in einer bei langer Dauer u. U. hinzukommenden Schädigung der Lungen. Auch PATTERSON u. STARLING, ANITSCHKOFF u. TRENDELENBURG, KRAYER u. a. beobachteten am HLP des Hundes das Auftreten von Lungenödemen bei längerer Versuchsdauer bzw. bei Belastung des Herzens. Kleine Laboratoriumstiere wie Ratte und Meerschweinchen scheinen jedoch in dieser Hinsicht wesentlich empfindlicher zu sein. Weitere Versuche müssen zeigen, ob die Resultate bei größerer Erfahrung noch verbessert werden können. Je kürzer der Zeitraum vom Ende der Präparation bis zum Auftreten der Insuffizienz war, desto weniger wurden unsere Ergebnisse durch diese Schwierigkeit beeinflußt.

Bei guter Übereinstimmung hinsichtlich Entstehung und Verlauf der Spontaninsuffizienz zeigten sich große Unterschiede zwischen Ratten- und Meerschweinchenherzen bei der Vergiftung mit Somnifen: Während bei der Ratte erst Dosen von 20—40 mg wirksam waren, dann aber regelmäßig unter Anstieg des Vorhofdrucks und Herabsetzung des Minutenvolumens zu einer starken Bradykardie und häufig zu Lungenödem[1] führten, bewirkten beim Meerschweinchen schon Dosen von 4 bis 16 mg einen starken Anstieg des Vorhofdrucks bei geringem Abfall von Minutenvolumen und Frequenz. Auch am Hunde-HLP wird bei Barbituratvergiftung die Frequenz nur unbedeutend herabgesetzt (FARAH u. MARESH; GOLLWITZER-MEIER u. KRÜGER). Das Rattenherz scheint also in dieser Hinsicht anders zu reagieren. Die Somnifeninsuffizienz war bei der Ratte im Gegensatz zum Meerschweinchen durch Strophanthin nicht zu beeinflussen. Die Ausgangsbedingungen für eine therapeutische Strophanthinwirkung waren wegen der starken Bradykardie von vornherein ungünstig.

GENUIT ermittelte am geschlossenen Coronarkreislauf des isolierten Ratten- und Meerschweinchenherzens die in 40 min zum Herzstillstand führenden Konzentrationen mit 1:30000 bzw. 1:800000. Die in unseren Versuchen im Augenblick des Herzstillstandes erreichten Konzentrationen bei Zufuhr der weiter oben angegebenen Strophanthinmengen betrugen bei der Ratte 1:17000, beim Meerschweinchen 1:362000. In den Versuchen von GENUIT wurde also von Anfang an die toxisch wirksame Konzentration angeboten, während in unseren Versuchen die Konzentration fortlaufend anstieg und die von uns als letal bezeichnete Konzen-

[1] Eine Schädigung der Lungen bei Barbituratvergiftung wurde auch von BARIETY u. KOHLER an Kaninchen beobachtet.

tration erst im Augenblick des Herzstillstandes erreicht war. Dadurch sind die Unterschiede der Ergebnisse in den zur Erzielung eines Herzstillstandes benötigten Konzentrationen wohl ohne weiteres zu erklären. Die Relation der von Genuit an Meerschweinchen und Ratten benötigten Konzentrationen stimmt jedoch mit unseren Ergebnissen überein.

Die am Ganztier bei i.v. Injektion ermittelte letale Dosis von k-Strophanthin wird für die Ratte mit 9,4 mg/kg angegeben (Mehnert). Die von anderen Autoren gefundenen Werte liegen etwa in der gleichen Größenordnung (vgl. Hatcher u. Eggleston; Straub). Lediglich Farah fand mit 77,1 mg/kg/Std (in 60—100 min injiziert) eine wesentlich höhere Dosis; diese ist sicher auf die langsame Infusionszeit zurückzuführen. Beim Meerschweinchen liegt die letale Dosis bei 0,42 mg/kg (Genuit; vgl. auch Hoffmann u. Lendle; Fromherz u. Bächtold). Die Relationen der am Ganztier bestimmten letalen Dosen von Meerschweinchen und Ratte (1:22,6) stimmen mit den am isolierten Herzen (1:26,7) und am HLP (1:21,3) gefundenen etwa überein; dies ist eine weitere Bestätigung dafür, daß die Verteilungsverhältnisse kein ausschlaggebender Faktor für die höhere Resistenz der Ratte sein können.

Als optimale Infusionszeiten werden für die Ratte 12 min (Mehnert), beim Meerschweinchen etwa 15 min (Hoffmann u. Lendle; Fromherz u. Bächtold) angegeben (keine Übertitration, keine Elimination). In unseren Versuchen betrug die Zeit von Infusionsbeginn bis zum Eintritt des Herzstillstandes 20—50 min. Da am HLP höchstens eine Übertitration bei sehr schneller Verabreichung, dagegen kaum eine Elimination zu befürchten ist, liegen unsere Infusionsgeschwindigkeiten sicher in einem günstigen Bereich. Es käme lediglich eine Zerstörung von Strophanthin durch Rattenblut in Betracht; die Versuche mit Schweineblut ergaben aber keine wesentlichen Unterschiede in der Dosierung.

Nach den Ergebnissen unserer Arbeit ist auch das insuffiziente Rattenherz mit Strophanthin therapeutisch zu beeinflussen. Die eben wirksame Dosis lag im Mittel bei 87,5 γ entspr. 4,95% der letalen Dosis. Am Meerschweinchen betrug die therapeutische Dosis 11,9 γ entspr. 14,3% der letalen Dosis. Bei methodisch vergleichbaren Versuchen von Farah u. Maresh am HLP des Hundes betrug die therapeutische Dosis von g-Strophanthin 19% der letalen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Strophanthin am Rattenherzen eine größere therapeutische Breite besitzt als bei den Herzen anderer Tierarten. Die hohe Resistenz der Ratte gegenüber Strophanthin scheint also nicht gleichermaßen auch für therapeutische Dosierungsbereiche zu gelten. Für genaue Zahlenangaben ist indessen unser Versuchsmaterial zu gering.

Die von Reiter verwendeten Konzentrationen ($3{,}3 \cdot 10^{-5}$ M = etwa 1:50000) liegen bereits im toxischen Bereich. Die Unterschiede zu unseren Ergebnissen sind offenbar auf die größere Resistenz der elektrisch gereizten Kammermuskulatur zurückzuführen. Die von Hoffmann u. Lendle beobachteten extrakardialen Wirkungen von k-Strophanthin an der glatten Muskulatur von Darm und Milz sowie die von Hotovy u. Erdniss nachgewiesene Leistungssteigerung des quergestreiften

Muskels treten dagegen größenordnungsmäßig etwa bei gleicher Dosierung auf wie unsere therapeutischen Effekte.

Zusammenfassung

Am Herz-Lungen-Präparat der Ratte und des Meerschweinchens wurde durch intermittierende Belastung des rechten Herzens sowie durch Vergiftung mit Somnifen eine Insuffizienz erzeugt und die Wirkung von k-Strophanthin am insuffizienten Ratten- und Meerschweinchenherzen geprüft.

Bei der Ratte war die bei mäßiger Belastung entstandene Insuffizienz in 11 Versuchen durch Strophanthin therapeutisch zu beeinflussen. Die therapeutische Dosis lag im Mittel bei 81,1 γ/g Herzgewicht und betrug 4,95% der letalen Dosis. Bei der Somnifeninsuffizienz war Strophanthin ohne Wirkung.

Beim Meerschweinchen war Strophanthin in 2 Fällen von Spontaninsuffizienz sowie 5 Fällen von Somnifeninsuffizienz von günstiger Wirkung. Die therapeutische Dosis betrug 11,4 γ/g Herzgewicht entspr. 14,3% der letalen Dosis.

Danach hat Strophanthin bei der Ratte die größere therapeutische Breite.

Für die vielseitige Förderung der vorliegenden Arbeit sind wir Herrn Prof. Dr. F. Eichholtz sowie Herrn Dr. R. Taugner zu großem Dank verpflichtet.

Literatur

Anitschkoff, S. W., u. P. Trendelenburg: Die Wirkung des Strophanthins auf das suffiziente und auf das insuffiziente Warmblüterherz. Dtsch. med. Wschr. **1928**, 1672. — Bariety, M., et D. Kohler: Action des barbituriques dans l'oedème pulmonaire aigu expérimental du lapin. C. r. Soc. Biol. (Paris) **145**, 182 (1951). — Begovič, S., u. P. Stern: Das Cardio-Pulmonal-Präparat der Ratte. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 333 (1953). — Bine, R., M. Friedman, S. O. Byers and C. Bland: The deposition of digitoxin in the tissues of the rat after parenteral injection. Circulation (New York) **4**, 105 (1951). — v. Boros, B.: Schlagfrequenz und Herzgewicht. Z. inn. Med. **3**, 343 (1948). — Braun, W., K. H. Althoff und R. Taugner: Bubble flow meter mit automatischer Registrierung. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 529 (1954). — Clark, A. J.: The factors determining tolerance of glucosides of the digitalis series. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **4**, 399 (1912/13). — Farah, A.: On the elimination of g-strophanthin by the rat. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **86**, 248 (1946). — Farah, A., and G. Maresh: Determination of the therapeutic, irregularity, and letal doses of cardiac glycosides in the heart lung preparation of the dog. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **92**, 32 (1948). — Fromherz, K., u. H. P. Bächtold: Zeitfaktoren bei der Digitaliswertbestimmung am Meerschweinchen. Helvet. physiol. Acta **8**, 454 (1950). — Genuit, H.: Zur Frage der hohen Digitalisresistenz der Ratte. Untersuchung über die Glykosidspeicherung des isolierten Herzens am geschlossenen Coronarkreislauf. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **188**, 285 (1938). — Genuit, H., u. W. H. Eschbach: Über die Bindungs- und Verteilungsbedingungen von Digitoxin und k-Strophanthin am Meerschweinchen nach Versuchen am geschlossenen Coronarkreislauf

des isolierten Herzens. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **188**, 302 (1938). — Gollwitzer-Meier, Kl., u. E. Krüger: Herzenergetik und Strophanthinwirkung bei verschiedenen Formen der experimentellen Herzinsuffizienz. Pflügers Arch. **238**, 251 (1937). — Gunn, J. A.: The congenital tolerance of the rat to strophanthus. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **4**, 225 (1912/13). — Harrison: Failure of the circulation. Baltimore 1935. (Zit. nach Hoffmann u. Wienke.) — Hatcher, R. A.: The absorption, excretion, and destruction of strophanthin. Amer. J. Physiol. **23**, 303 (1908). — Hatcher, R. A., and C. Eggleston: Studies in the elimination of certain of the digitalis bodies from the animal organism. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **12**, 405 (1919). — Hoffmann, G., u. L. Lendle: Kritisches zur Digitalisauswertung am Meerschweinchen. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 376 (1951). — Hoffmann, G., u. L. Lendle: Nachweis extrakardialer Digitaliswirkungen an der Ratte. II. Mitteilung. Darm- und Gefäßwirkung. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 184 (1953). — Hoffmann, G., u. H. Wienke: Zur Frage der verschiedenen Empfindlichkeit des Ratten- und Meerschweinchenherzens gegen Digitalis und andere Kontrakturgifte (Ba, Ca). Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 225 (1953). — Hotovy, R., u. H. Erdniss: Pharmakologische Studien am Musculus masseter der Ratte. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 204 (1950). — Kisch, F., u. H. Schwarz: Zur Wirkung des Strophanthins bei Sauerstoffmangel. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 557 (1936). — Knowlton, F. P., and E. H. Starling: The influence of variations in temperature and blood pressure on the performance of the isolated mammalian heart. J. of Physiol. **44**, 206 (1912). — Krayer, O.: Versuche am insuffizienten Herzen. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **162**, 1 (1931). — Masuoka, D. T., and P. R. Saunders: Positive inotropic action of ouabain on rat ventricle strips. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **74**, 879 (1950). — Mehnert, H.: Über die Prüfung der Kumulationsneigung verschiedener herzwirksamer Substanzen am Warmblüter. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **184**, 181 (1937). — Patterson, S. W., and E. H. Starling: On the mechanical factors which determine the output of the ventricles. J. of Physiol. **48**, 357 (1914). — Reiter, M.: Wirkung von Strophanthin auf Kontraktionskraft und Sauerstoffverbrauch des Herzstreifens der Ratte. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 315 (1953). — Sjoerdsma, A., and C. S. Fischer: The fixation of radioactive digitoxin by isolated hearts. Circulation (New York) **4**, 100 (1951). — Straub, W.: Über die Resistenz der Ratte gegen k-Strophanthin. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **84**, 223 (1919). — Weese, H.: Digitalisverbrauch und Digitaliswirkung im Warmblüter. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **135**, 228 (1928).

Dr. M. v. Bubnoff, Pharmakologisches Institut der Universität Heidelberg

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 123—128 (1955)

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Kiel (Direktor: Prof. Dr. H. Reinwein)
und dem Institut für Tierphysiologie und Tierernährung
(Direktor: Prof. Dr. H. Stotz)

Über die Ausscheidung des 6-Sulfanilamido-2,4-dimethyl-pyrimidins und seines Acetylderivates durch die gesunde menschliche Niere

Von
F. Portwich, H. Büttner und J. Paulini*

(Eingegangen am 22. Juli 1955)

Die Sulfonamide werden im menschlichen Körper an ihrer freien Aminogruppe zum Teil acetyliert. Der prozentuale Anteil der acetylierten Verbindung am Gesamtsulfonamid (Acetylierungsgrad) hängt in beträchtlichem Ausmaß von der chemischen Struktur des betreffenden Sulfonamids ab, ist andererseits aber auch individuellen Schwankungen unterworfen. Bei den meisten Sulfonamiden ist der Acetylierungsgrad im Urin höher als im Serum (vgl. z. B. 3). In nur geringem Maße wird im menschlichen Organismus das 6-Sulfanilamido-2,4-dimethyl-pyrimidin** acetyliert[4, 8, 9]. Als durchschnittlichen Acetylierungsgrad für das Sulfadimethylpyrimidin findet Gsell[4] im Blut 10% und im Urin etwa 20%, Röttger[9] im Serum 5% und im Urin 10%. Vergleicht man den Acetylierungsgrad im Serum mit dem des zur gleichen Zeit durch die Niere gebildeten Urines (Gewinnung mittels Blasenkatheters), so ergeben sich bei Sulfadimethylpyrimidin Acetylierungsgrade gleicher Größenordnung in Serum und Urin. Der Grund für dieses auffällige Verhalten kann in einer Verzögerung der Ausscheidung des Acetylderivates gegenüber der Ausscheidung der freien Base zu suchen sein. Bei den bisher untersuchten Sulfonamiden liegt der umgekehrte Fall einer Verzögerung in der Ausscheidung der freien Verbindung vor. Clearance-Untersuchungen verschiedener Autoren[3, 7, 12] haben ergeben, daß freie Sulfonamide zum Teil in beträchtlichem Ausmaß rückresorbiert werden, während die Acetylderivate keine Rückresorption, in einigen Fällen sogar eine Sekretion in den Tubuli erfahren. Auf diese Weise kommt es zu einer Verzögerung in der Ausscheidung der freien Sulfonamide. Im Falle des Sulfadimethylpyrimidins lag es nun nahe zu prüfen, ob das Acetylderivat möglicherweise rückresorbiert wird. Ein weiterer Grund für eine Verzögerung der Ausscheidung des Acetyl-Sulfadimethylpyrimidins könnte darin zu suchen

* J. Paulini, Inaug. Dissert. Kiel 1955.
** „Aristamid" (Nordmark-Werke); „Elkosin" (Ciba AG).

sein, daß das Acetylderivat in größerem Ausmaß als die freie Base in einer nicht durch die Niere filtrierbaren, etwa an Eiweiß gebundenen Form vorliegt.

Im folgenden soll über Clearances des Sulfadimethylpyrimidins und seines Acetylderivates berichtet werden.

Methodik

1. Die Bestimmung des freien und acetylierten Sulfonamids. Die Sulfonamidbestimmung erfolgte nach der Methode von Krebs und Franke, bei der die freie Aminogruppe nach Diazotierung mit N-Dimethyl-1-naphthylamin gekuppelt wird. Der entstehende rote Azofarbstoff wird im Eppendorf-Photometer bei 546 nm photometriert. Zur Bestimmung des gesamten Sulfonamids wurde diese Vorschrift dahingehend abgeändert, daß 5 ml vom Filtrat der Eiweißfällung mit 5 ml 5 n NaOH eine Stunde bei 100° C verseift und nach Neutralisierung mit 5 ml 5 n HCl mit 3 ml eines Acetatpuffers (141,3 g Eisessig und 295 g Natriumacetat (kristallwasserhaltig) mit Aqua dest. ad 1000,0) versetzt und mit Wasser aufgefüllt werden. Wegen weiterer Einzelheiten der Methode sei auf die Originalarbeit[5] verwiesen.

Genauigkeit der Bestimmung: Der mittlere Fehler bei der Bestimmung des freien und des gesamten Sulfonamids wurde durch eine größere Anzahl von Bestimmungen am gleichen Serum ermittelt. Die erhaltenen Werte sind in der Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 1. *Mittlerer Fehler für die Bestimmung des freien und gesamten Sulfonamids*

Bestimmung	Anzahl	Serumgehalt Sulfadimethylpyrimidin	mittl. abs. Fehler	mittl. relativ. Fehler (%)
freies Sulfadimethylp.	24	10—15 mg-%	± 0,05	± 0,5—0,3%
gesamtes Sulfadimethylp.	24	10—15 mg-%	± 0,08	± 0,8—0,5%

Nach Angaben der Literatur[3, 11] liegt die Hauptschwierigkeit bei der Bestimmung des Gesamtsulfonamids darin, daß bei der Hydrolyse nicht nur die acetylierte Aminogruppe freigesetzt, sondern auch das Sulfonamidmolekül selbst angegriffen wird, woraus im allgemeinen zu niedrige Werte resultieren. Wir haben uns deshalb zunächst an einer größeren Serie von Paralleluntersuchungen überzeugt, daß die Hydrolyse im Falle des Sulfadimethylpyrimidins ohne Einfluß auf die Bestimmung des freien Sulfonamids ist, d. h., daß wir bei der Bestimmung des freien Sulfadimethalpyrimidins mit und ohne Hydrolyse gleiche Werte fanden:

Bei 22 an einem Serum ohne Hydrolyse durchgeführten Bestimmungen im Mittel 9,99 mg-% ($\sigma = \pm 0{,}05$), bei 22 Analysen des gleichen Serums mit Hydrolyse im Mittel 10,01 mg-% ($\sigma = \pm 0{,}10$) freies Sulfadimethylpyrimidin.

Weiter haben wir eine bestimmte Menge zugesetztes Sulfadimethylpyrimidin quantitativ wiedergefunden:

a) Eine genau 10,0 mg-%-Lösung von Acetyl-Sulfadimethylpyrimidin (analysenrein, getrocknet), das sind 8,69 mg-% freies Sulfadimethylpyrimidin, ergab 8,6 bzw. 8,8 mg-%.

b) Eine Lösung von 10,0 mg-% freiem und 5,0 mg-% acetyliertem Sulfadimethylpyrimidin (= 4,34 mg-% berechnet als freie Base) ergab 14,36 mg-% gesamtes und 10,14 mg-% freies, also 4,22 mg-% acetyliertes Sulfonamid (berechnet als freie Verbindung).

Genauigkeit der Bestimmung des acetylierten Sulfonamids: Der Fehler bei der Bestimmung der acetylierten Verbindung ist, da es sich um eine Differenzbestimmung handelt, naturgemäß sehr hoch. Eine Abschätzung ist auf Grund der in Tab. 1 angegebenen absoluten mittleren Fehler für freies und gesamtes Sulfonamid möglich. Der absolute Größtfehler für die Acetylverbindung ergibt sich durch Addition dieser mittleren Fehler. Im Bereich der bei unseren Clearances vorkommenden Werte folgt als absoluter Fehler für die Acetylverbindung 0,05 + 0,08 = 0,13. Findet man z. B. 0,8 mg-% Acetylverbindung, so gilt 0,8 ± 0,13 mg-% bzw. ± 16%.

2. *Bestimmung des Inulins nach* Kreienberg *und* Czok. Das Inulin wurde nach hydrolytischer Spaltung als Fructose mit Resorcin im Eppendorf-Photometer bei 509 nm (Cd) bestimmt.

3. *Durchführung der Clearance.* Bei 11 nierengesunden Vp. wurden durch gleichzeitige Dauertropfinfusion von Inulin („Inulin puriss. pyrogenfrei", Laevosan) und Sulfadimethylpyrimidin („Aristamid", Nordmark-Werke*) annähernd konstante Blutspiegel erzeugt.

2 Std vor Beginn der Dauertropfinfusion wurden je nach Körpergewicht und Größe etwa 1,5 g Aristamid i.v. injiziert. ½ Std vor Beginn des Dauertropfes wurden etwa 1 g Aristamid i.v. gegeben und anschließend die ½ stündliche „Schnellinfusion" mit 2 g Inulin/200 ml physiol. NaCl-Lösung (etwa 200 Tropfen/min) begonnen. Die Dauertropfinfusionslösung enthielt auf 600 ml physiol. NaCl-Lösung 3 g Inulin + 1 g Aristamid (etwa 36 Tropfen/min). Die Inulinclearance wurde nach der üblichen Methodik in 3 Perioden zu je 40 min ermittelt. Daneben wurden in den gewonnenen Serum- und Urinproben freies und gesamtes Sulfonamid bestimmt.

4. *Berechnung der Sulfonamidclearance* (vgl. dazu[1]). Aus den erhaltenen Serum- und Urinwerten an Inulin (der Serumgehalt in der Mitte einer Urinsammelperiode wird jeweils aus dem arithmetischen Mittel der Anfangs- und Endwerte errechnet) wird die Inulinclearance, d. h. das Glomerulusfiltrat in der üblichen Weise ermittelt. Aus den Serummittelwerten (mg/ml) der einzelnen Perioden für freies und acetyliertes Sulfonamid folgt durch Multiplikation mit der Inulinclearance die gesamte filtrierte Menge an freiem und acetyliertem Sulfonamid (mg/min). Die tatsächlich im Urin ausgeschiedene Menge (mg/min) ergibt sich aus dem Sulfonamidgehalt des Urines (mg/ml) durch Multiplikation mit der Urinmenge (ml/min). Ist dieser Wert kleiner als der oben berechnete für das insgesamt filtrierte Sulfonamid, so kann man annehmen, daß eine Rückresorption stattgefunden hat. Die Menge an rückresorbiertem Sulfonamid (mg/min) errechnet sich als Differenz. Für die Clearance des Sulfonamids gilt

$$\text{Clearance}_S = \frac{\text{Uringehalt (mg/ml)} \cdot \text{Urinmenge (ml/min)}}{\text{Serumgehalt (mg/ml)}}.$$

Schließlich bezeichnet man das Verhältnis der Clearances zur Inulinclearance als Clearance-Ratio. Zur Erläuterung sei die Berechnung an einem Beispiel durchgeführt (3. Periode von Versuch Nr. 9):

Inulinclearance 113,7 ml/min, bei 1,2 ml Urin/min. Freies Sulfadimethylpyrimidin im Serum 0,124, im Urin 4,38 mg/ml. Acetyliertes Sulfadimethylpyrimidin im Serum 0,008, im Urin 0,11 mg/ml. Für die insgesamt filtrierte Menge an Sulfonamid folgt für die freie Verbindung $0{,}124 \cdot 113{,}7 = 14{,}10$ mg/min, für die acetylierte Verbindung 0,91 mg/min. Die tatsächlich im Urin ausgeschiedene Menge an freiem Sulfonamid beträgt $4{,}38 \cdot 1{,}2 = 5{,}26$ mg/min. Der entsprechende Wert für das Acetylderivat beträgt 0,13 mg/min. Also wurden in der betrachteten

* Wir haben an dieser Stelle den Nordmark-Werken für Überlassung von Aristamid-Versuchsmengen, sowie anderweitiger Unterstützung zu danken.

Clearanceperiode 14,10 — 5,26 = 8,84 mg/min (entsprechend 63%) des freien Sulfonamids rückresorbiert. Für das Acetylderivat ergibt sich analog eine Rückresorption von 86%. Die $Clearance_{s,\,frei}$ errechnet sich nach obiger Gleichung zu 42,4 ml/min, die $Clearance_{s,\,acetyl}$ zu 16,5 ml/min.

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der 11 Clearance-Untersuchungen mit insgesamt 34 Perioden sind in Tab. 2 zusammengestellt. Aus Platzmangel konnten in

Tabelle 2. *Ergebnisse der Clearanceversuche*

Nr.	Sulfadimethylpyrimidin				Urin (ml/min)	Clearance (ml/min)			Clearance-Ratio	
	Serumgehalt (mg/ml)		Acetylierungsgrad (%)			Inulin	Sulfadimethylpyrimidin			
	frei	acet.	Serum	Urin			frei	acet.	frei	acet.
1/1	0,131	0,005	3,7	1,9	4,0	87,3	31,8	16,0	0,36	0,18
1/2	0,130	0,006	4,4	2,7	2,3	67,7	25,1	15,3	0,37	0,23
1/3	0,129	0,007	5,1	3,4	2,0	89,5	30,9	20,0	0,35	0,22
3/1	0,175	0,007	3,8	1,5	6,3	87,3	46,1	18,0	0,53	0,21
3/2	0,170	0,009	5,0	2,4	2,8	51,0	27,2	12,4	0,53	0,24
3/3	0,163	0,011	6,3	2,7	3,3	74,8	29,3	12,0	0,39	0,16
4/1	0,117	0,006	4,9	4,8	1,0	87,2	39,0	38,3	0,45	0,44
4/2	0,115	0,006	5,0	4,9	1,1	106,6	44,6	44,0	0,42	0,41
4/3	0,113	0,006	5,0	5,0	1,1	82,0	42,8	42,2	0,52	0,51
5/1	0,178	0,005	2,7	2,8	1,3	84,4	17,5	18,2	0,21	0,22
5/2	0,164	0,006	3,5	3,2	1,1	77,5	18,4	16,5	0,24	0,21
5/3	0,150	0,007	4,5	4,0	1,1	81,3	19,4	17,3	0,24	0,21
6/1	0,130	0,006	4,4	4,3	2,3	81,8	27,2	26,8	0,33	0,33
6/2	0,125	0,008	6,0	6,0	2,1	71,3	26,5	26,2	0,37	0,37
6/3	0,123	0,009	6,8	6,6	1,9	71,4	26,4	25,3	0,37	0,35
7/1	0,129	0,003	2,3	3,3	3,2	130,4	36,2	53,3	0,28	0,41
7/2	0,123	0,004	3,1	4,3	2,0	142,1	43,6	60,0	0,31	0,42
7/3	0,117	0,004	3,3	3,9	1,3	153,7	43,6	52,0	0,28	0,34
8/1	0,140	0,004	2,2	0,7	0,9	97,7	38,2	9,0	0,39	0,09
8/2	0,138	0,005	3,5	0,9	0,7	104,6	37,7	9,8	0,36	0,09
8/3	0,139	0.006	4,1	1,4	0,7	104,3	35,8	11,7	0,34	0,11
9/1	0,136	0,005	3,5	1,1	1,2	95,1	40,9	12,0	0,43	0,13
9/2	0,130	0,007	5,1	1,2	1,2	102,4	38,6	8,6	0,38	0,08
9/3	0,124	0,008	6,1	2,4	1,2	113,7	42,4	16,5	0,37	0,15
10/1	0,134	0,002	1,5	2,7	0,8	110,5	34,9	64,0	0,32	0,58
10/2	0,130	0,003	2,3	2,8	0,9	111,9	37,9	48,0	0,34	0,43
10/3	0,130	0,004	3,0	3,1	1,7	106,6	36,2	38,2	0,34	0,36
11/1	0,116	0,002	1,7	5,7	0,4	84,9	28,4	—	0,33	—
11/2	0,133	0,004	2,9	1,8	0,4	82,5	26,9	16,0	0,33	0,19
11/3	0,136	0,005	3,5	2,5	0,3	81,0	25,8	18,0	0,32	0,22
12/1	0,174	0,002	1,1	2,7	0,9	97,4	26,2	63,0	0,27	0,65
12/2	0,171	0,004	2,3	2,6	1,0	99,4	26,3	30,0	0,26	0,30
12/3	0,166	0,005	2,9	1,6	0,9	96,8	26,1	14,4	0,27	0,15
12/4	0,159	0,006	3,6	3,5	0,8	101,7	28,1	26,7	0,28	0,26

der Tabelle nicht alle Zahlenwerte angegeben werden. Während die Sulfonamid-Clearance ebenso wie die Inulin-Clearance von Gewicht und Größe abhängig ist, können die Werte der Clearance-Ratio bei verschiedenen Personen miteinander verglichen werden, da bei diesem Quotienten der Einfluß von Gewicht und Größe weitgehend fortfällt. Aus diesem Grunde kann auch ein Mittelwert für die Clearance-Ratio angegeben werden, für das freie Sulfadimethylpyrimidin beträgt sie im Mittel 0,35 ($\sigma = \pm 0{,}08$), für das Acetylderivat im Mittel 0,28 ($\sigma = \pm 0{,}14$). Beim Hund beträgt die Clearance-Ratio für freies Sulfadimethylpyrimidin nach Dutz u. a.[1a] 0,3—0,75.

Die gefundenen niedrigen Clearancewerte zeigen, daß eine beträchtliche Rückresorption bei freiem und acetyliertem Sulfadimethylpyrimidin, und zwar bei beiden Verbindungen in etwa gleichem Maße, stattfindet. Das kann auch bei dem hohen Fehler der Acetyl-Sulfonamid-Bestimmung (s. o.) mit Sicherheit gefolgert werden.

Findet eine Bindung der Sulfonamide an Serumeiweißkörper statt, dann kann eine „korrigierte Clearance" berechnet werden[1], in die der Serumgehalt an filtrablem, ungebundenem Sulfonamid eingeht. Für Sulfapyrimidin-Derivate wird in der Literatur der eiweißgebundene Anteil sehr hoch angegeben[1]*.

Wir verzichteten bei der Auswertung unserer Ergebnisse bewußt auf eine Berechnung der korrigierten Clearance, einerseits weil eine exakte Bestimmung des eiweißgebundenen Anteiles Schwierigkeiten bereitet, andererseits da auch darüber noch Unklarkeiten bestehen, ob der durch Dialyse-Versuche gefundene ungebundene Sulfonamidanteil tatsächlich allein von der Niere ausgeschieden wird.

Interessant ist noch der Vergleich der gefundenen renalen mit der totalen Clearance des Sulfadimethylpyrimidins, die nach einer Methode von Schwarz** ermittelt werden kann. Bei einer Versuchsperson (60,9 kg, 1,74 m, 38 J.) erhielten wir bei einer Infusionsgeschwindigkeit von 5,2 mg/min Sulfadimethylpyrimidin über längere Zeit einen konstanten Serumspiegel von 0,136 mg/ml, die totale Clearance beträgt also 38 ml/min, die renale Clearance des Gesamtsulfonamids macht mit 28,8 ml/min (Mittel) 76% der totalen Clearance aus.

Für ihre Hilfe danken wir Fräulein M. v. Graffen.

* Zur Orientierung über den an Eiweiß gebundenen Anteil haben wir in einigen Versuchen sulfadimethylpyrimidinhaltiges Serum bei 37° C 56 Std gegen physiol. NaCl-Lösung in einem Cellophan-Dialysierschlauch dialysiert, wobei sich das freie Sulfonamid zu etwa 50%, das acetylierte fast vollständig an Eiweiß gebunden erwies.

** Nach Schwartz gilt bei konstantem Serumspiegel durch Dauerinfusion:

$$\text{Totale Clearance (ml/min)} = \frac{\text{Infusionsgeschwindigkeit (mg/min)}}{\text{Serumspiegel (mg/ml)}}.$$

Zusammenfassung

1. Die Acetylierungsgrade von 6-Sulfanilamido-2,4-dimethylpyrimidin (Aristamid, Elkosin) in Serum und Urin sind in den ersten 6 Std nach i.v. Zufuhr im Gegensatz zu anderen Sulfonamiden größenordnungsmäßig gleich.

2. Gleichzeitige Clearances des Sulfadimethylpyrimidins und des Inulins beim Gesunden wurden mit Hilfe der Infusionsmethode ermittelt.

3. Acetyl-Sulfadimethylpyrimidin wird im Gegensatz zu Acetyl- Verbindungen anderer Sulfonamide rückresorbiert, und zwar in etwa gleichem Maße wie die freie Verbindung.

4. Die Rückresorption des Acetyl-Sulfadimethylpyrimidins gestattet eine Erklärung für die beobachtete Übereinstimmung der Acetylierungsgrade von Serum und Urin.

Literatur

[1] Dost, F. H.: Der Blutspiegel. Leipzig: G. Thieme 1953. — [1a] Dutz H., A. Krautwald u. G. Kretzschmar: Z. inn. Med. **9**, 387 (1954). — [2] Fisher, H. H., L. Troast, A. Waterhouse and J. A. Shannon: J. of Pharmacol. **79**, 373 (1943). — [3] Frisk, A. R.: Acta med. scand. (Stockh.) Suppl. **142**, (1943). — [4] Gsell, O.: Schweiz. med. Wschr. **1944**, 1095. — [5] Krebs, K. G., u. H. Franke: Klin. Wschr. **1939**, 1248. — [6] Kreienberg, W., u. G. Czok: Vorschrift der Laevosan-Gesellschaft. — [7] Loomis, T. A., R. S. Hubbard and G. F. Koepf: Amer. J. Physiol. **139**, 197 (1943). — [8] Meier, R., O. Allemann u. H. v. Meyenburg: Schweiz. med. Wschr. **1944**, 1091. — [9] Röttger, H.: Ther. Gegenw. **1950**, 419. — [10] Schwartz, I. L.: Amer. J. Physiol. **160**, 526 (1950). — [11] Scudi, J. V.: J. Labor. a. Clin. Med. **25**, 404, 409 (1940). — [12] Sekula, M.: Z. klin. Med. **142**, 221 (1943).

Dr. F. Portwich, Kiel, Med. Univ.-Klinik

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 129—141 (1955)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Erlangen

Über die Bedeutung der Phenylisopropylamingruppe in einigen heterocyclischen Verbindungen*

Von

Fred Leuschner, Annemarie Leuschner und Fritz Heim

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 11. Mai 1955)

Die sogenannten Weckamine, besonders Benzedrin und Pervitin, zeichnen sich durch einen vorwiegend zentralen Angriffspunkt aus. Eine recht ausgeprägte Wirkung ist die Beeinflussung der Motilität. Sie ist maximal bei einer bestimmten Anordnung der Phenylisopropylamin-(PIA)-gruppe. Der Vergleich verschiedener Derivate zeigt, daß diese Struktur sehr empfindlich gegen konfigurative Eingriffe ist. Durch Substitution kann die Wirkung vermindert (z. B. OH-, CH_3O-, NH_2-Gruppen) oder gesteigert werden (z. B. Methylierung am N). Selbst die optischen Antipoden unterscheiden sich wesentlich. Der Gedanke einer Wirkungsgruppierung mit spezifischen pharmakologischen Eigenschaften scheint somit nahezuliegen. In den vergangenen Jahren wurden heterocyclische Verbindungen synthetisiert (Panizzon; Brown und Werner; Tripod, Sury und Hoffmann; Thomä und Wick), die in ihrer Konstitution PIA enthalten und sich pharmakologisch zum Benzedrin verwandt erwiesen. Außerdem ist die PIA in einer Anzahl zentral wirksamer Alkaloide zu finden, ohne daß eine Beziehung zum Benzedrin leicht ablesbar wäre. Untersuchungen über die allgemeine Bedeutung dieser Wirkungsgruppe schienen somit berechtigt.

Die Benzedrinklasse zeigt eine gewisse Verwandtschaft mit dem Morphin, die sich nicht nur auf den vorwiegend zentralen Angriffspunkt beschränkt, sondern auch in einer beiden gemeinsamen bewegungsbeeinflussenden Wirkung äußert. Sie ist allerdings beim Morphin weit mehr als beim Benzedrin in Richtung und Intensität von der Tierart abhängig. Ähnlich wie beim Benzedrin wechselt diese Wirkung stark mit konfigurativen Eingriffen am Molekül. Die Frage nach der motilitätswirksamen Struktur führt zu der im Morphin — neben mehreren anderen Teilstrukturen — enthaltenen PIA-Anordnung des Benzedrins.

Die Berechtigung, im Morphin eine Eigenschaft des Gesamtmoleküls mit einer Teilstruktur verknüpft zu denken, ergibt sich aus den Untersuchungen, die zur

* Herrn Prof. Dr. Dr. K. Schübel zum 70. Geburtstag gewidmet.

Dolantin- bzw. Polamidonklasse führten (Eisleb, Schaumann, Bockmühl, Ehrhart). Auch hier liegt die Bindung von Morphineigenschaften an eine Molekülvereinfachung vor, nämlich eine bestimmte Phenyl-n-propyl-aminstruktur mit einem quartären C-Atom in γ-Stellung (oder nach Modelluntersuchungen von Gero, der 4-Phenylpiperidingruppe). Diese Dolantingrundstruktur stellt — neben dem PIA — eine zweite Verknüpfung des N-Atoms mit dem Benzolkern des Morphins dar. Bemerkenswert scheint, daß Moleküle, die im wesentlichen diese Molekülvereinfachung enthalten, lediglich unspezifisch eine motilitätsbeeinflussende Wirkung entfalten (Schaumann).

Ziel der im folgenden beschriebenen Versuche soll die Beantwortung der Frage sein, ob durch Substanzen, denen die PIA-Gruppe gemeinsam ist und die als strukturelle Glieder zwischen Benzedrin und Morphin aufgefaßt werden können, eine pharmakologische Verbindung zwischen beiden Stoffklassen hergestellt werden kann. Ein Teil der untersuchten Körper zeigt die benzedrin-morphinähnliche PIA-Konfiguration. Bei anderen Verbindungen wurde das C-Atomgerüst des PIAs durch Einführung von Doppelbindungen und ungesättigten Radikalen räumlich verändert, um zu Aussagen über die Spezifität der Gruppe zu gelangen. Im Vordergrund der Betrachtungen stand die Prüfung der Motilität. Als Vergleichssubstanzen dienten Pervitin und Dromoran (dessen C-Atomgerüst dem des Morphins entspricht). Als Versuchstier für die Motilitätsbestimmung wurde die weiße Maus verwendet, die nicht nur durch ihre besondere Empfindlichkeit für bewegungsbeeinflussende Substanzen ausgezeichnet ist, sondern auch eine gleichgerichtete (motilitätssteigernde) Reaktion auf Benzedrin- und Morphinabkömmlinge zeigt.

Geprüft wurden die in Tab. 1 zusammengefaßten Verbindungen. Sie sind in gesättigte bzw. teilgesättigte und ungesättigte Substanzen unterteilt.

I. Beeinflussung der Motilität

Methodik. Der quantitative Vergleich von bewegungsbeeinflussenden Substanzen, die unterschiedliche Bewegungsarten und -rhythmen hervorrufen, erfordert ein Meßverfahren, das keine Form selektiv bevorzugt. Sowohl die einseitige Messung der Lauftätigkeit und der Bewegung einzelner Körperteile als auch die Auswahl der Motilität durch Resonanzerscheinungen des Meßsystems verfälschen den Vergleich. In Anlehnung an Zitterkäfigmethoden wurde ein Verfahren benutzt, das Bewegungen unabhängig von der Erscheinungsform nach der Impulsgröße erfaßt.

Prinzip: Die Bewegungen üben als Schwerpunktsverlagerungen auf die Standfläche Impulse aus. Die Messung dieser Bewegungsgrößen gelingt fast unabhängig von Verlagerungen des Körpergewichtes und Resonanzerscheinungen mit einer Waage (Stoßwaage). Wird deren Schwingungsdauer groß gegen die Stoßdauer gewählt, dann entspricht der Ausschlag der Waage der Größe des Impulses. Die vielseitig gerichteten Bewegungen führen dazu, daß die Waage praktisch um ihre Ausgangslage pendelt. Die Ausschläge werden nach Zahl und Größe über eine Photozelle von einem Impulssammler erfaßt.

Anordnung. Als Impulsüberträger wurden handelsübliche Briefwaagen verwendet (Empfindlichkeit der ersten Skala, die bis 50 g reicht, 0,2 g pro Skalenteil, der zweiten Skala, bis 250 g, 1 g). Parallel oder im spitzen Winkel unter dem Zeiger (A) der Waage wurde ein weiterer zweiarmiger Hebel (B) angebracht. Ein Aluminiumdraht stellte eine bewegliche Verbindung zwischen A und B her. B war aus sehr leichtem Aluminiumrohr, besser noch aus einem gerade gewachsenen, wenig elastischen Strohhalm gefertigt. Zur Korrektur der Waage war der Drehpunkt von B gegen die Waage in der Vertikalen verschiebbar. Die von uns verwendeten Apparate zeigten zwischen A und B ein Übersetzungsverhältnis von 1 : 10. Am distalen Arm des Hebels B war das Meßgitter angebracht. Es besaß Durchbrüche für den Lichtstrahl zur Photozelle. Spaltweite und -abstand sind von der geforderten Empfindlichkeit abhängig. Die Weite betrug bei unseren Apparaturen 3 mm, die Länge des Schlitzes 15 mm. Die Stoßausschläge der Mäuse entsprechen einer Belastung der Waage von im Mittel 3 g, dabei glitten 5 Spalte an der Ausgangslage des Meßgitters vorüber. Das Gitter bestand aus dünnem schwarzen Karton, der in alkoholischer Schellacklösung gefestigt und mit zwei dünnen Aluminiumdrähten verstärkt war. Mit der Länge des proximalen Armes vom Hebel B wurde die Eigenfrequenz der Waage moduliert. Die Schwingungsdauer sollte mindestens 2 bis 3 Sekunden betragen.

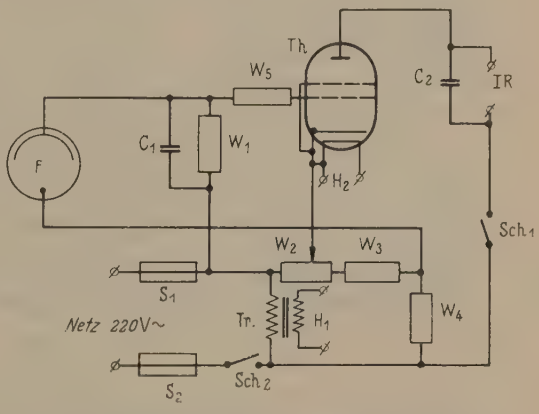


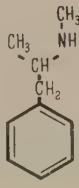
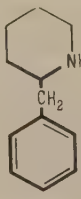
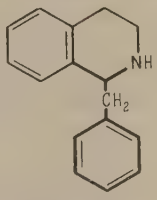
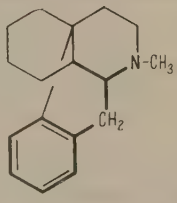
Abb. 1. Schema des elektronischen Schalters. IR Anschluß für den dekadischen Impulsraffer; *Th* Thyratron (Philips PL 21); W_1 Widerstand 1 MΩ; W_2 Potentiometer 5 kΩ; W_3 Widerstand 20 kΩ; W_4 Widerstand 60 kΩ; W_5 Widerstand 100 kΩ, C_1 Kondensator 10000 pF; C_2 Kondensator 25 μF; S_1 und S_2 Sicherungen 200 mA; *F* Photozelle (Philips 3546); *Tr* Heiztransformator 110/220 V, 6,3 V, 1,5 A; H_1 und H_2 die zueinander gehörigen Anschlüsse des Heizstromes; Sch_1 und Sch_2 Schalter

Um den Versuchstieren die Möglichkeit zu geben, sich in gewohntem Ausmaß frei umherzubewegen, hatte der Käfig einen Durchmesser von 12 bis 25 cm (Gewicht bis 150 g) und war aus dunklem engmaschigen Draht gefertigt. Der Boden bestand aus einer Kunststoffolie. Der Deckel aus dünnem Aluminiumblech war mit einem Gummiband auf dem Käfig fixiert. Die Photozelle, die sich in einer Hülse mit einem 3 × 15 mm großen Spalt befand, und die Lichtquelle (50 Watt) waren dem Meßgitter gegenüber angeordnet. Der Abstand des Gitters von der Blende betrug wenige mm, konnte jedoch während der Messung ohne nennenswerten Einfluß auf das Ergebnis der Registrierung um 4 mm schwanken. Die Schaltung der elektronischen Anlage zeigt die Abb. 1. Zwischen dem Schließen des Schalters 1 und 2 sollten mindestens 10 Sekunden Anheizzeit für das Thyratron liegen.

Zum Zählen der Impulse des elektronischen Schalters verwendeten wir einen im Telephonverkehr üblichen elektromechanischen, sogenannten dekadischen Impulsraffer[1]. Die von der Photozelle empfangenen Impulse transportieren über einen Magnetkontakt ein kleines mit 10 Ziffern bewehrtes Rad, das in dekadischen Abständen jeweils ein weiteres gleiches Rad mitnimmt. Der Zähler gestattet vier-

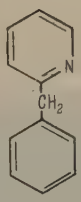
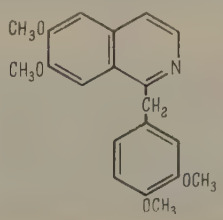
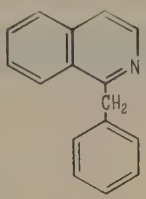
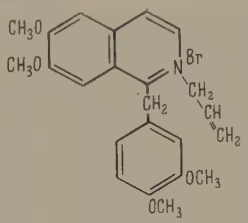
[1] ELMEG, Elektromechanik G.m.b.H., Peine/Hann.

Tabelle 1

	Name	Formel der Base	Darstellung
A	*Gesättigte bzw. teilgesättigte Verbindungen*		
1	d-α,N-Dimethyl-β-phenyläthylamin-hydrochlorid (Pervitin)		Handelsübliches Präparat
2	d,l-2-Benzylpiperidin-hydrochlorid		Darstellung nach W. L. C. Veer und St. Goldschmidt F.$_{(HCl)}$ 136—137° (korr.)[1]
3	d,l-1-Benzyl-1, 2, 3, 4-tetrahydroisochinolin-hydrochlorid		Darstellung nach W. Leithe F.$_{(HCl)}$ 173° (korr.)[1]
4	(-)-3-Oxy-N-methyl-morphinan-tartrat (Dromoran)		Handelsübliches Präparat

[1] Ausgangssubstanzen wurden freundlicherweise von den Firmen E. Merck A.G., Darmstadt, und Farbwerke Hoechst A.G., Frankfurt (M)-Hoechst, zur Verfügung gestellt. Dafür sei nochmals gedankt.

Tabelle 1

	Name	Formel der Base	Darstellung
B	*Ungesättigte Verbindungen*		
5	2-Benzylpyridiniumnitrat		Darstellung nach E. H. Hundress und H. C. Walter F.$_{(HNO_3)}$ 113—114° (korr.)[1]
6	Papaverin-hydrochlorid		Handelsübliches Präparat (E. Merck A.G., Darmstadt)
7	1-Benzylisochinolin-hydrochlorid		
8	N-Allylpapaverin-bromid		Darstellung nach dem allgemeinen Verfahren von H. Decker und O. Klauser: 1,7 g Papaverin und 0,6 g Allylbromid im Einschlußrohr für 3—4 Std auf dem siedenden Wasserbad. Die Masse färbte sich gelbgrün und war wasserlöslich. Umkristallisiert aus Äthylalkohol und Wasser. F.$_{(Br)}$ 170° (korr.). Entfärbt alkoholische $KMnO_4$-Lösung und wäßrige Bromlösung. Analyse: Gef. C 59,44%, H 5,94%, N 3,27% Ber. C 60,00%, H 5,69%, N 3,04%

stellige Impulszahlen abzulesen. Über Kontakte kann jeder 10., 100. und 1000. Impuls registriert werden.

Außer dem Impulsraffer läßt sich die Apparatur einfach im Laboratorium zusammenstellen. Abb. 2 zeigt ein Registrierbeispiel. Die unmittelbare Schreibung der Bewegung erfolgte über den Hebel B.

Fehlermöglichkeiten. 1. Bei der Auswahl der Waagen ist darauf zu achten, daß die Führung der Teile wenig Seitwärtsbewegungen zuläßt. Bei hohen Ansprüchen

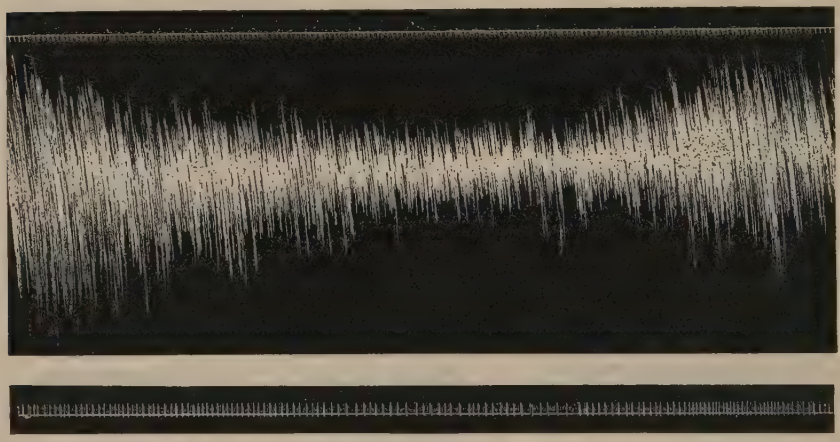


Abb. 2. Registrierbeispiel (Maus XXVI, 0,0032 mg Pervitin pro Gramm Körpergewicht, Sattelkurve)

an die Genauigkeit ist unter Umständen eine lockere Achsenführung durch eine gut passende zu ersetzen. 2. In den von uns verwendeten Apparaturen betrugen Spaltweite und -abstand des Meßgitters 3 mm, so daß Amplituden des Hebels B unter 4 mm Höhe nicht registriert wurden. Wir wählten diese Mindesthöhe, um eine erschütterungsfreie Aufstellung der Geräte vermeiden zu können. Verkleinerung von Spaltweite und -abstand führte bei uns zur Registrierung vorübergehender Personen. 3. Die Zählgeschwindigkeit wird durch den elektromechanischen Impulsraffer auf 10 bis 15 pro Sekunde begrenzt. Erfahrungsgemäß werden diese Zahlen auch bei maximaler Erregung unter Pervitin und Dromoran nicht erreicht. 4. Die üblichen Schwankungen im Stromnetz führen nicht zu Störungen im Registrierbetrieb. Jedoch empfiehlt es sich, den Apparat nach längerer Außerbetriebsetzung zu kontrollieren: Die Registrierempfindlichkeit wird durch mehrfaches Vorbeiführen des Meßgitters vor der Photozelle in der Zeiteinheit geprüft. Eine für das Gerät eingestellte Frequenz muß dann erreicht werden. Die Empfindlichkeit der Waage kann durch Belastung mit Gewichten festgestellt werden.

Versuchstiere: Die weißen Mäuse wurden in 4-tägigen Abständen einem Untersuchungsgang unterzogen, wobei gelegentliche Leerversuche mit NaCl-Lösung mit den Substanzprüfungen abwechselten. Die Verbindungen wurden in 0,1 ml 0,9prozentiger NaCl-Lösung s. c. verabreicht. Jeder Untersuchung, die zu einem für das Tier regelmäßigen Zeitpunkt begann, ging eine $1\frac{1}{2}$- bis 2-stündige Gewöhnungszeit im Käfig der Stoßwaage voraus.

Verhalten unbehandelter Mäuse auf der Stoßwaage

Von 85 weißen Mäusen wurde die Normalbewegung nach der Käfiggewöhnung bestimmt. Die Untersuchungsdauer betrug 3 bis 4 Stunden. Aus den Gesamtimpulszahlen wurden die Stundenmittelwerte berechnet. Die Ergebnisse zeigt die Tab. 2. Die Schwankungen der Normalbewegung des Einzeltieres wurden an 6 Tieren mit jeweils 10 Einzelbestimmungen gefunden. Der σ-Wert von B ist das arithmetische Mittel der Abweichungen der Einzeltiere. Der Vergleich der Streuung des Kollektivs (A) mit dem des Einzeltieres (B) gab keinen Anlaß, die häufig geübte Auswahl bewegungsgeeigneter Tiere vorzunehmen.

Tabelle 2

	Zahl der untersuchten Mäuse	Zahl der Messungen pro Maus	Mittelwerte der pro Stunde gemessenen Impulse	Mittlere quadratische Abweichung des Einzelwertes σ	Mittelwertes ε
				Impulse	
A	85	1	1020	625	68
B	6	10	1010	500	208

Verhalten der Mäuse nach Behandlung mit den in Tab. 1 genannten Verbindungen

Wird die PIA-Struktur zum 2-Benzylpiperidin bzw. zum 1-Benzyltetrahydroisochinolin ergänzt (Tab. 1 A, Verbindung 2 und 3), so bleibt die motilitätssteigernde Wirkung des Grundkörpers erhalten. Das molare Verhältnis der Verbindungen zueinander zeigt die Abb. 3, die relativen Gewichtsbeziehungen die Tab. 3a.

2-Benzylpiperidin und 1-Benzyltetrahydroisochinolin, die sich in Wirkungsdauer, -stärke und molarer Dosierung größenordnungsmäßig gleich verhalten, stehen den wesentlich überlegenen Vergleichssubstanzen gegenüber, die ihrerseits große Differenzen zeigen. Die unterschiedliche Neigung der Dosis-Wirkungs-Kurven von Pervitin und Dromoran veranschaulicht, daß geringe Motilitätssteigerungen durch etwa äquimolare Dosen erreicht werden können, die maximale Steigerung dagegen wesentlich höhere Dromoran- als Pervitindosen erfordert. Die Kurven in Abb. 3 zeigen weiterhin, daß nach Überschreiten eines Erregungsmaximums höhere Dosen wieder bewegungsärmere Zustände herbeiführen. Ein Beispiel hierfür ist in Abb. 2 wiedergegeben. Die Sattelform der Kurve kommt dadurch zustande, daß nach s. c. Injektion einer großen Pervitinmenge durch Anfluten und wieder Abfluten des Pervitins am Zentralnervensystem dort zweimal eine maximal erregende, dazwischen aber vorübergehend erregungshemmende Konzentration vorherrscht.

Die ungesättigten Verbindungen (Tab. 1b) besitzen das C-Atomgerüst des PIAs, jedoch wird dessen Konfiguration durch die Zahl der Doppelbindungen wesentlich modifiziert. Dem kleinsten Molekül, dem 2-Benzylpyridin, ist noch eine schwache zentral erregende Wirkung eigen (Tab. 3a), aber erst in sehr hoher Dosierung. Bei den wesentlich vergrößerten Benzylisochinolinderivaten führt der ungesättigte Charakter

dagegen zum Verlust der erregenden Wirkung, die das Bild der hydrierten analogen Verbindung, des 1-Benzyltetrahydroisochinolins, beherrscht. Die Substanzen hemmen die spontane Beweglichkeit und verhalten sich

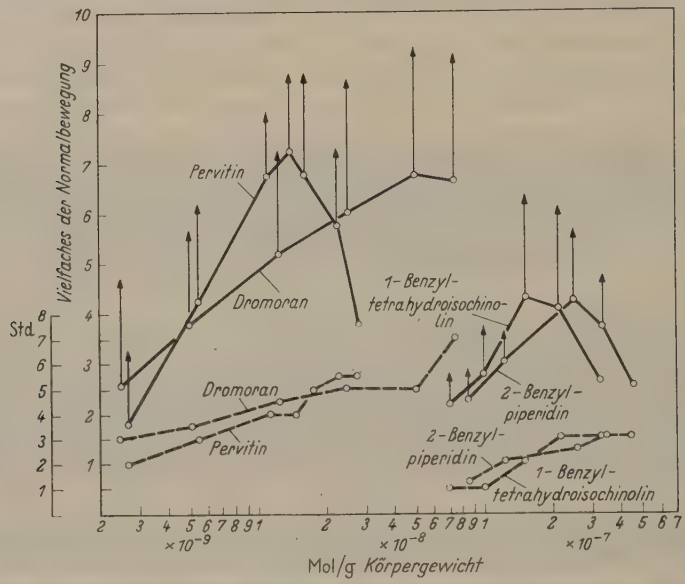


Abb. 3. Wirkungsstärke und Wirkungsdauer der in Tab. 1 A genannten Verbindungen. —— Wirkungsstärke — — — Wirkungsdauer. Als Normalbewegung wurde die des Kollektivs gewertet (Tab. 2). Eingetragen wurden nur die gegen die Normalbewegung sicheren Werte (Wahrscheinlichkeit 1:50 nach R. A. Fisher). Die aus Raumgründen lediglich nach oben eingetragenen Pfeile entsprechen den σ-Werten

antagonistisch zu Pervitin und 1-Benzyltetrahydroisochinolin. Zur Prüfung der motilitätshemmenden Wirkung wurde der Pervitinantagonismus gewählt. Als Pervitindosis wurde jene verwendet, die die Normalbewegung (Tab. 2A) verdreifacht. Die Substanzen wurden unmittelbar

Tabelle 3a

	Verdreifachung der Normalbewegung		
	ED Dosis in mg/g Maus	Wirkungsdauer in Stunden	$\frac{LD_{50}}{ED}$ (teilweise aus Tab. 7)
Pervitin	0,0007	2,4	46[1]
2-Benzylpiperidin	0,025	1,5	8
1-Benzyltetrahydroisochinolin	0,035	1,5	4
Dromoran	0,0012	3,2	90[2]
2-Benzylpyridin	0,290	1,2	5,2

[1] LD_{50} nach Hauschild.

[2] LD_{50} nach Stoelting, Theye u. Graf zit. nach Haas, Hohagen u. Kollmannsperger.

nach dem Pervitin verabreicht. Aus den auf mindestens 4 Dosierungen fußenden Dosis-Wirkungs-Kurven ($n = 12$ Mäuse) wurde die ED_{50} (diejenige Dosis, die eine 50%ige Erniedrigung der durch Pervitin hervorgerufenen Verdreifachung herbeiführt) graphisch ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 3b zusammengestellt.

Tabelle 3b

	ED_{50} in mg/g Maus	σ in mg/g Maus	$\frac{LD_{50}\text{ (aus Tab. 7)}}{ED_{50}}$
1-Benzylisochinolin . . .	0,040	0,008	17
Papaverin	0,032	0,011	5,3
N-Allylpapaverin	0,012	0,006	3,2

II. Wirkung auf den isolierten Meerschweinchendarm

In diesen Versuchen wurde verglichen, wie sich die in Tab. 1 genannten Verbindungen auf den durch Acetylcholin (20 μg/1000 ml), Bariumchlorid (100 mg/1000 ml) und Histamin (20 μg/1000 ml) beeinflußten Darm (Versuchsanordnung nach Magnus) verhalten.

Eine Beziehung zwischen der motilitätsbeeinflussenden und der Darmwirksamkeit konnte nicht beobachtet werden (Tab. 4). Die gesättigten wie die ungesättigten Verbindungen (Tab. 1, Verbindungen 2, 3, 5—8) hemmten die Testeffekte in ungefähr gleichen Konzentrationen. Lediglich das N-Allylpapaverin zeigte bis zu den untersuchten hohen Dosen keinen hemmenden Effekt, führte jedoch zu einer Empfindlichkeitssteigerung des Darmes gegen Histamin. Diese Wirkung ließ sich durch äquivalente Mengen Papaverin verhindern bzw. aufheben.

Tabelle 4. *Grenzkonzentrationen für die Abschwächung der Testreaktionen am isolierten Darm. (Wegen der großen Inkonstanz der verschiedenen Darmstückchen Annäherungs- oder Mittelwerte)*

	Acetylcholin	Bariumchlorid	Histamin
Pervitin . . . . . (Hemmung sehr unregelmäßig und nie vollständig)	8×10^{-6}	8×10^{-6}	$4 — 8 \times 10^{-6}$
2-Benzylpiperidin . .	$4 \times 10^{-6} — 10^{-5}$	$4 \times 10^{-6} — 10^{-5}$	$4 \times 10^{-6} — 10^{-5}$
1-Benzyltetryhydro- . isochinolin	$4 \times 10^{-6} — 10^{-5}$	10^{-5}	6×10^{-6}
Dromoran	bis 10^{-4} keine Wirkung		
2-Benzylpyridin . . .	$1{,}6 \times 10^{-5}$	$1{,}2 — 1{,}6 \times 10^{-5}$	$1{,}2 — 1{,}6 \times 10^{-6}$
Papaverin	2×10^{-6}	$2 — 4 \times 10^{-6}$	$2 — 4 \times 10^{-6}$
1-Benzylisochinolin .	8×10^{-6}	8×10^{-6}	$4 — 8 \times 10^{-6}$
N-Allylpapaverin . .	bis 2×10^{-4} keine Wirkung		4×10^{-6} verstärken die Histaminwirkung um etwa 100%.

Die spezifische Beeinflussung der Darmperistaltik durch Analgetika mit der 4-Phenylpiperidinstruktur veranlaßte entsprechende Untersuchungen. Sie wurden am isolierten Meerschweinchendarm in der Versuchsanordnung nach Trendelenburg vorgenommen. Während nach

Tabelle 5. *Grenzkonzentrationen für die Abschwächung der Peristaltik am isolierten Meerschweinchendünndarm nach* Trendelenburg (Mittelwerte)

Pervitin	$2{,}5 \times 10^{-5}$
2-Benzylpiperidin	$1{,}6 \times 10^{-5}$
1-Benzyltetryhydroisochinolin	10^{-5}
Dromoran	$1{,}6 \times 10^{-6}$
2-Benzylpyridin	$2{,}5 \times 10^{-5}$
Papaverin	$4{,}0 \times 10^{-6}$
1-Benzylisochinolin	$6{,}0 \times 10^{-6}$
N-Allylpapaverin	$1{,}6 \times 10^{-4}$

Schaumann bei den 4-Phenylpiperidinderivaten eine Parallelität zur analgetischen Wirksamkeit besteht, muß eine Abhängigkeit von der motilitätsbeeinflussenden Wirkung der untersuchten Substanzen verneint werden (Tab. 5).

III. Wirkung auf den Blutdruck der Katze

Am Katzenblutdruck verhielten sich die stärker gesättigten Verbindungen unterschiedlich zu den ungesättigten. 2-Benzylpiperidin und 1-Benzyltetrahydroisochinolin führten bei intravenöser Verabreichung zu einer wenige Minuten dauernden pressorischen Phase, der abhängig vom initialen Blutdruck eine kurze Blutdrucksenkung vorausgehen kann. Durch Ergotamin wurde die pressorische Phase nicht umgekehrt, sondern nur abgeschwächt. Die ungesättigten Verbindungen führten dagegen zu einer ausgeprägten Blutdrucksenkung, die durch Ergotamin verstärkt wurde. Die Grenzkonzentrationen sind in Tab. 6 zusammengefaßt (Annäherungswerte).

Tabelle 6. *Grenzkonzentrationen für die Beeinflussung des Blutdruckes* (Katze, Chloralose-Narkose, intravenöse Verabreichung)

	Grenzdosis mg/kg	Wirkungsrichtung
2-Benzylpiperidin	0,25	press.
1-Benzyltetrahydroisochinolin	0,5	press.
2-Benzylpyridin	0,6	depress.
1-Benzylisochinolin	0,1	depress.
Papaverin	0,05	depress.
N-Allylpapaverin	0,3	depress.

IV. Toxicität

Die LD_{50} wurde unter gleichen äußeren Bedingungen an weißen Mäusen ($n = 20$—25, 24 Std-Grenze) bei s. c. Verabreichung bestimmt und nach Kärber ausgewertet (Tab. 7).

Tabelle 7

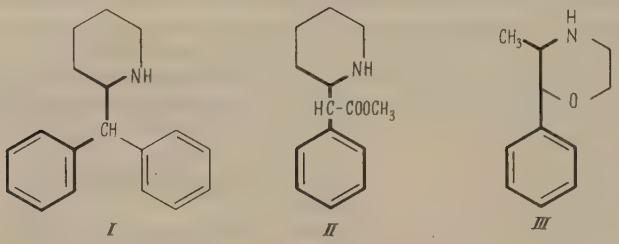
	LD_{50} in mg/g Maus	Vergiftungsbild
2-Benzylpiperidin	0,195	Lebhafte Motorik, Unruhe, fast pausenloses Herumlaufen, Zitterbewegungen, Exophthalmus, Krämpfe, bei einzelnen Tieren Schwanzphänomen.
1-Benzyltetrahydroisochinolin	0,140	
2-Benzylpyridin	1,500	
1-Benzylisochinolin	>0,700	(Löslichkeitsbegrenzung)
Papaverin	0,170	—
N-Allylpapaverin	0,038	Atmungsverlangsamung, komatöser Zustand, der Tod tritt nach Stunden ein.

Besprechung der Ergebnisse

2-Benzylpiperidin und 1-Benzyltetrahydroisochinolin können sowohl nach der Anordnung der PIA-Gruppe als auch nach der Art der Ringsysteme als Glieder zwischen Morphin und Benzedrin aufgefaßt werden. Die Berechtigung, von diesen Körpern eine mit Benzedrin gleichgerichtete zentrale Beeinflussung zu erwarten, ergab sich aus Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, daß die Öffnung oder Schließung hydrierter Ringe ohne wesentliche Änderung der pharmakologischen Eigenschaften erfolgen kann. Mutch u. Pembrey fanden z. B. zentralerregende Wirkung bei Schließung des PIAs zum β-Tetrahydronaphthylamin und Külz beobachtete die Erhaltung der Eigenschaften von Tetrahydropapaverin und Lobelin bei Öffnung der hydrierten Ringe. Entsprechende Derivate des PIAs, die zum Piperidinringschluß geeignet sind, prüfte Hauschild erfolgreich auf ihre zentralerregende Wirksamkeit.

In den vorgelegten Untersuchungen wurde gezeigt, daß durch den Ringschluß die pharmakologische Wirkungsrichtung erhalten bleibt. Das von Hauschild untersuchte Di-N-n-propyl-α-methyl-β-phenyläthylamin, das in Teilstrukturen einem geöffneten 2-Benzylpiperidin entspricht, führt bei einer Dosierung von 0,005 mg/g Maus zur Erregung. Die entsprechende Dosis beim 2-Benzylpiperidin beträgt 0,015 mg/g. In den vergangenen Jahren wurden bei mehreren heterocyclischen Verbindungen, die bei Anwendung der aufgeführten Gesichtspunkte ebenfalls als PIA-Abkömmlinge bezeichnet werden können, zentralerregende Eigenschaften gefunden. So beobachteten Brown und Werner beim 2-(Diphenyloxymethyl)-piperidin eine zentralerregende Wirkung, Tripod, Sury u. Hoffmann beim 2(-Diphenylmethyl)-piperidin (s. nachstehende Formel I) und Meier, Gross und Tripod beim Phenyl-piperidyl(2)-essigsäuremethylester (Ritalin, II). Eine sehr verwandte Ringbildung liegt im 2-Methyl-3-phenylmorpholin (Preludin, III) von Thomä und Wick

vor. Unsere Befunde tragen zum Verständnis der zentralerregenden Wirkung dieser Stoffe bei.



I *II* *III*

Werden Morphinderivate als Körper mit dem Grundskelet des 1-Benzylisochinolins aufgefaßt, so mußte die Prüfung hydrierter Benzylisochinolinderivate für eine Verknüpfung mit dem 2-Benzylpiperidin und Benzedrin aufschlußreich sein. Den hydrierten Benzylisochinolinabkömmlingen fehlt vom Morphin-C-Atomgerüst lediglich noch eine zweite, von der PIA-Gruppe unabhängige Bindung des Benzolkerns mit dem hydrierten Isochinolin. Diese Struktur entspricht der bedeutsamen Anordnung im Dolantin, der aber nach Schaumann Motilitätssteigerung nur sehr unregelmäßig und in toxischen Dosen anhaftet. Abb. 3 und Tab. 6 zeigen, daß 1-Benzyltetrahydroisochinolin in einigen pharmakologischen Eigenschaften dem 2-Benzylpiperidin und Dromoran verwandter ist als den ungesättigten 1-Benzylisochinolinderivaten.

Die Spezifität der PIA-Konfiguration wird durch die Wirksamkeitsänderungen deutlich, die mit der Einführung von Doppelbindungen und ungesättigten Radikalen verbunden sind. Die chemischen Abwandlungen führen nicht zu einem Eingriff in das C-Atomgerüst, modifizieren jedoch die Wirkungsradien der betroffenen Molekülteile so, daß die räumliche Beziehung des N-Atoms zum Benzolkern wesentlich verändert wird. Die motilitätssteigernde Wirkung schlägt dabei in eine sedative, zum Pervitin und 1-Benzyltetrahydroisochinolin antagonistische Wirksamkeit um. Auch in der Wirkung auf den Blutdruck unterscheiden sich die gesättigten bzw. teilgesättigten von den ungesättigten Substanzen. Das 2-Benzylpyridin, ein zwar ungesättigtes, aber räumlich verhältnismäßig eng gepacktes Molekül, verhält sich wie die ungesättigten Verbindungen in seiner Wirkung auf den Blutdruck, wie die gesättigten in seiner Wirkung auf die Motilität.

Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und quantitativer pharmakologischer Wirkung lassen sich bei Benzedrin- und ähnlich bei Morphinabkömmlingen nur mit gewissen Vorbehalten aufzeigen. Bedeutenden Einfluß übt die Substitution auf den Wirkungsgrad aus. Sie kann den quantitativen Vergleich von Verbindungen besonders bei komplexer Substitution erschweren oder auch zu einer völligen Maskierung der

pharmakologischen Wirksamkeit führen. Die geringe Motilitätssteigerung des 2-Benzylpiperidins und des 1-Benzyltetrahydroisochinolins beruht so teilweise auf dem Fehlen fördernder Hilfsgruppierungen (Methylierung am N) und dem Vorliegen eines Gemisches wahrscheinlich unterschiedlich wirksamer optischer Antipoden.

Zusammenfassung

1. Die hydrierten heterocyclischen Verbindungen, 2-Benzylpiperidin und 1-Benzyltetrahydroisochinolin, die als Teilstruktur die Phenylisopropylamingruppe besitzen, ordnen sich durch ihre zwar schwächere, aber ausgeprägte motilitätssteigernde Wirkung bei der Maus als Glieder zwischen Benzedrin und der Morphingruppe ein.

2. Von den ungesättigten analogen Verbindungen ruft lediglich 2-Benzylpyridin eine geringe Motilitätssteigerung hervor, 1-Benzylisochinolin, Papaverin und N-Allylpapaverin hemmen dagegen die spontane Motilität und beeinflussen Pervitin antagonistisch.

3. Die hydrierten Verbindungen führen zu einer kurzdauernden Blutdrucksteigerung, die durch Ergotamin nur abgeschwächt wird, die ungesättigten zur Blutdrucksenkung.

4. Es wird eine Methode zur quantitativen Messung der Motilität von Mäusen und Ratten beschrieben. Sie benutzt die Stoßwaage als Bewegungsüberträger. Die Ausschläge der Waage werden annähernd integrierend über eine Photozelle gemessen.

Literatur

Bockmühl, M., G. Ehrhart u. O. Schaumann: Liebigs Ann. **561**, 52 (1949). — Brown, B. B., and H. W. Werner: Federat. Proc. **12**, 1003 (1953). — Decker, H., u. O. Klauser: Ber. dtsch. chem. Ges. **37**, 520 (1904). — Eisleb, O.: Med. u. Chemie **4**, 213 (1942). — Eisleb, O., u. O. Schaumann: Dtsch. med. Wschr. **1939**, 967. — Fisher, R. A.: Statistical Methods for Research Workers. Edinburgh 1928. — Hauschild, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **191**, 465 (1938). — Hundress, E. H., and H. C. Walter: J. Amer. Chem. Soc. **70**, 3702 (1948). — Kärber, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **162**, 480 (1931). — Leithe, W.: Ber. dtsch. chem. Ges. **63**, 1498 (1930). — Magnus, R.: Pflügers Arch. **102**, 123 (1904). — Mutsch, N., and M. S. Pembrey: J. of Physiol. **43**, 109 (1911). — Panizzon, L.: Helvet. chim. Acta **27**, 1748 (1944); **29**, 324 (1946). — Schaumann, O.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **196**, 109 (1940); **216**, 48 (1952). — Stoelting, Theye u. Graf: zit. nach H. Haas, E. Hohagen u. G. Kollmannsperger: Arzneimittel-Forsch. **3**, 238 (1953). — Thomä, O., u. H. Wick: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 540 (1954). — Trendelenburg, P.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **81**, 55 (1917). — Veer, W. L. C., and St. Goldschmidt: Rec. Trav. chim. Pays-Bas **65**, 793 (1945)

Dr. Fred Leuschner, Erlangen, Pharmakol. Inst. d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol. Bd. 227, S. 142—148 (1955)

Aus der Staatlichen Anstalt für experimentelle Therapie „Paul-Ehrlich-Institut“ und dem Ferdinand-Blum-Institut für experimentelle Biologie zu Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. R. Prigge)

Über den Einfluß von Ephedrin, Pilocarpin und Megaphen auf die Bildung des Diphtherie-Antitoxins beim Kaninchen

(Vegetatives Nervensystem und Immunität)

II. Mitteilung

Von
H. W. Pedal und H. J. Enenkel

(Eingegangen am 10. August 1955)

1

In der vorausgegangenen Mitteilung (Enenkel u. Pedal) wurde berichtet, daß Kaninchen, die am Tage der intravenösen Immunisierung durch Diphtherie-Aluminium-Formol-Toxoid 3mal in 8stündigen Abständen mit Ephedrinhydrochlorid behandelt wurden, 14 und 32 Tage nach der Immunisierung einen höheren Antitoxintiter aufwiesen als die nicht oder mit Pilocarpin behandelten Tiere. Wir können zwar noch nicht ausschließen, daß der beobachtete pharmakologische Effekt auf die Antikörperbildung auch auf extraneuralen Wegen zustande kommt. Andererseits bestätigt unser Ergebnis frühere Arbeiten (Literatur s. I. Mitteilung) und neue Veröffentlichungen[1] (Stickl u. Kerstien), wonach dem vegetativen Nervensystem bzw. den vegetativ angreifenden Stoffen eine mehr oder minder große Einflußnahme auf die Antikörperbildung, besonders auf die ersten Phasen dieses Abwehrmechanismus beim heranwachsenden und erwachsenen Säugetier nicht abzusprechen ist. Unsere Befunde widersprechen auch nicht der kürzlich von Engelhardt u. Lendle gemachten Feststellung, daß Vögel — im Gegensatz zu Säugern — während der Embryonalzeit, also ohne intaktes Nervensystem, anaphylaktische Antikörper zu bilden vermögen; denn nach der Entwicklung des Nervensystems wird es auch solche Vorgänge beeinflussen können, die vorher ohne seine Mitwirkung abgelaufen sind.

In der vorliegenden Untersuchung haben wir erneut unter den Versuchsbedingungen der I. Mitteilung gearbeitet und haben im Vergleich hiermit in weiteren Versuchsgruppen die beiden Pharmaka in *protra-*

[1] Anmerkung bei der Korrekt.: s. a. Ungar.

hierter Dosierung angewendet. Außerdem wurde die Wirkung von *Megaphen* (Largactil) auf die einsetzende Antitoxinbildung des Kaninchens untersucht.

2

Soweit hier nicht ausgeführt, war die Versuchsanordnung die gleiche wie in der ersten Mitteilung. — 60 weiße Wiener Kaninchen im Gewicht von 2000—3200 g wurden auf Coccidienfreiheit untersucht und am 12. 1. 1954 ohne Berücksichtigung des Körpergewichtes mit 300 SE des auch früher benützten Diphtherie-Impfstoffes der Behring-Werke, Marburg/L., Diphtherie-Aluminium-Formol-Toxoid Ktr.-Nr. 182 (387 SE/cm³) intravenös immunisiert. Die Tiere 1—10 (1. Versuchsgruppe) wurden, abgesehen von der Immunisierung, nicht weiter behandelt. Die Tiere 11—20 (2. Versuchsgruppe) erhielten in 4stündigen Abständen insgesamt 12mal je 1,0 mg Pilocarpinum hydrochloricum puriss. cryst. „Merck" pro kg Körpergewicht intravenös injiziert, und zwar so, daß die immunisierende Injektion zeitlich 7—8 min nach der 3. Wirkstoffinjektion lag. Die Tiere 21—30 (3. Versuchsgruppe) erhielten in 4stündigen Abständen 12mal je 5 mg Ephedrinum hydrochlor. „Merck" pro kg Körpergewicht intravenös, die Immunisierung erfolgte ebenfalls 7—8 min nach der 3. Ephedrininjektion. Die Tiere 31—40 (4. Versuchsgruppe) erhielten in 6stündigen Abständen 6mal je 5 mg Megaphen[1] (Ampullen mit 2,5%iger Lösung ohne Kollidonzusatz) intravenös (1mal) und intramuskulär (5mal). Hier setzte die Immunisierung 7—8 min nach der 2. Megapheninjektion ein. Die Tiere 41—50 (5. Versuchsgruppe) erhielten wie die Gruppe 2 der I. Mitteilung 3mal in 8stündigen Abständen je 2,5 mg Pilocarpin pro kg Körpergewicht i.v., die 1. Pilocarpininjektion 7—8 min vor der Immunisierung. Die Tiere 51—60 (6. Versuchsgruppe) erhielten wie die Gruppe 3 der I. Mitteilung 3mal in 8stündigen Abständen je 12,5 mg Ephedrin pro kg Körpergewicht i.v., die 1. Injektion 7—8 min vor der Immunisierung. — Das Versuchstier Nr. 12 starb interkurrent (Verletzung). Dadurch bestand die 2. Gruppe (12mal Pilocarpin) für die Auswertung nur aus 9 Tieren. Für die *intracutane Titration der in den Seren enthaltenen zirkulierenden Antitoxine* nach der Methode von Römer-Fraser u. Wigham-Jensen wurde allen Tieren 1 Tag vor und 7, 14, 21 und 35 Tage nach der Immunisierung je 5—8 cm³ Blut aus der Ohrvene entnommen. Bis zur III. Blutentnahme einschließlich diente der LRm (1/30000 AE), bei der IV.—VI. Entnahme der LRm (1/3000 AE) als Titrationsbasis[2]. Alle Sera wurden einzeln titriert, bei der III.—VI. Blutentnahme aber auch die wieder unter Berücksichtigung der Körpergewichte hergestellten Mischsera jeder Gruppe geprüft. Die Toleranz der Haut der Versuchstiere gegen intracutan injiziertes Diphtherie-Toxin (intracutane Giftneutralisation durch sessile Antikörper) wurde 35 Tage nach der Immunisierung mit fallenden Dosen des Diphtherie-Standardtoxins T 1822 (LRm (0,001 AE) = $3{,}4 \cdot 10^{-4}$ mg) gemessen.

3

Die Resultate unserer Untersuchungen sind in der Tab. 1 zusammengefaßt. Sie bestätigen und erweitern die Befunde der I. Mitteilung: Gegenüber der unbehandelten Gruppe 1 zeigte sowohl die 3mal mit 12,5 mg/kg in 8stündigen Intervallen behandelte *Ephedringruppe* 6 als auch die 12mal mit 2,5 mg/kg in 4stündigem Intervall versehene Gruppe 3

[1] Für die freundliche Überlassung der Versuchsmengen danken wir Herrn Dr. Peters, Pharma-Büro BAYER, Frankfurt am Main.

[2] LRm = Limes Reactionis medius.

Tabelle 1

Gruppe		1		2		3		4		5		6	
Antitoxin-Titer (AE/cm³)		Impfstoff		Impfstoff und 12 Pilocarpin-Injektionen		Impfstoff und 12 Ephedrin-Injektionen		Impfstoff und 6 Megaphen-Injektionen		Impfstoff und 3 Pilocarpin-Injektionen		Impfstoff und 3 Ephedrin-Injektionen	
		Einzeltier	Gruppe	Einzeltier	Gruppe	Einzeltier	Gruppe	Einzeltier	Gruppe	Einzeltier	Gruppe	Einzeltier	Gruppe
		0,029		0,008		0,0001		0,015		0,010		0,056	
		0,021	*GM* =	—	*GM* =	0,071	*GM* =	0,006	*GM* =	0,006	*GM* =	0,022	*GM* =
a)	III	0,012	*0,011*	0,008	*0,010*	0,017	*0,015*	0,050	*0,013*	0,035	*0,016*	0,014	*0,019*
		0,012		0,013		0,016		0,023		0,028		0,010	
		0,037	*GAM* =	0,004	*GAM* =	0,068	*GAM* =	0,005	*GAM* =	0,041	*GAM* =	0,005	*GAM*
b)	14	0,007	0,015	0,021	0,012	0,010	0,038	0,007	0,019	0,036	0,023	0,035	0,023
		0,015		0,015		0,033		0,019		0,009		0,019	
c)	1/30000	0,003	*M* =	0,004	*M* =	0,010	*M* =	0,045	*M* =	0,047	*M* =	0,010	*M* =
		0,007	0,032	0,022	0,035	0,013	0,048	0,013	0,030	0,004	0,038	0,038	0,041
		0,005		0,011		0,124		0,005		0,041		0,024	
		0,26		0,18		0,007		0,14		0,09		0,37	
		0,10	*GM* =	—	*GM* =	0,39	*GM* =	0,02	*GM* =	0,03	*GM* =	0,14	*GM* =
a)	IV	0,07	*0,067*	0,03	*0,060*	0,07	*0,138*	0,25	*0,095*	0,26	*0,107*	0,21	*0,169*
		0,06		0,10		0,21		0,17		0,10		0,02	
		0,23	*GAM* =	0,03	*GAM* =	0,74	*GAM* =	0,07	*GAM* =	0,38	*GAM* =	0,09	*GAM* =
b)	21	0,02	0,093	0,10	0,069	0,06	0,227	0,10	0,110	0,20	0,153	0,81	0,234
		0,09		0,10		0,45		0,13		0,26		0,27	
c)	1/3000	0,04	*M* =	0,02	*M* =	0,06	*M* =	0,03	*M* =	0,05	*M* =	0,20	*M* =
		0,03	0,101	0,05	0,078	0,14	0,199	0,20	0,105	0,03	0,166	0,14	0,220
		0,04		0,05		0,40		0,04		0,09		0,17	

Tabelle 1 (Fortsetzung)

	0,38		0,24		0,007		0,17		0,11		0,20	
	0,11	*GM* =	—	*GM* =	0,28	*GM* =	0,03	*GM* =	0,04	*GM* =	0,10	*GM* =
a) V	0,10	*0,10*	0,04	*0,08*	0,17	*0,16*	0,35	*0,10*	0,41	*0,15*	0,40	*0,20*
	0,12		0,09		0,10		0,23		0,27		0,03	
	0,30	*GAM* =	0,06	*GAM* =	1,08	*GAM* =	0,06	*GAM* =	0,17	*GAM* =	0,08	*GAM* =
b) 28	0,01	0,14	0,14	0,09	0,11	0,30	0,12	0,14	0,17	0,18	0,49	0,25
	0,13		0,14		0,61		0,07		0,29		0,36	
c) 1/3000	0,09	*M* =	0,03	*M* =	0,19	*M* =	0,34	*M* =	0,07	*M* =	0,34	*M* =
	0,08	0,13	0,08	0,08	0,08	0,27	0,03	0,14	0,08	0,21	0,34	0,24
	0,06		0,03		0,27		0,04		0,17		0,25	
	0,41		0,30		0,01		0,13		0,13		0,37	
	0,59	*GM* =	—	*GM* =	0,41	*GM* =	0,07	*GM* =	0,08	*GM* =	0,12	*GM* =
a) VI	0,16	*0,12*	0,03	*0,08*	0,12	*0,20*	0,59	*0,14*	0,34	*0,20*	0,26	*0,23*
	0,07		0,11		0,11		0,24		0,36		0,03	
	0,27	*GAM* =	0,09	*GAM* =	1,40	*GAM* =	0,05	*GAM* =	1,17	*GAM* =	0,13	*GAM* =
b) 35	0,02	0,17	0,11	0,10	0,12	0,40	0,17	0,19	0,22	0,31	0,65	0,30
	0,20		0,10		1,07		0,07		0,24		0,67	
c) 1/3000	0,14	*M* =	0,02	*M* =	0,15	*M* =	0,46	*M* =	0,07	*M* =	0,29	*M* =
	0,04	0,25	0,08	0,08	0,10	0,31	0,08	0,27	0,09	0,32	0,31	0,34
	0,04		0,08		0,31		0,07		0,18		0,24	

a) Nr. der Blutentnahme; b) Tage nach der Immunisierung; c) Titrationsbasis (AE); *GM* = Geometrisches Mittel der Einzeltier-Serumtitrationen; *GAM* = Mit den Körpergewichten errechnetes gewogenes arithmetisches Mittel dieser Titrationen; *M* = Mischserum, den Körpergewichten entsprechend hergestellt (0,2 cm^3/kg) und titriert.

Die Resultate der I. und II. Blutentnahme (1 Tag vor und 7 Tage nach der Immunisierung) sind nicht aufgeführt, weil die Titer in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle nicht meßbar waren.

durchweg höhere geometrische Mittelwerte, was sich für die 6. Gruppe bei der IV. Blutentnahme 21 Tage nach der Immunisierung mit $0{,}02 \leqslant P \leqslant 0{,}05$ sichern ließ. Die gleiche Sicherung ergab sich bei Zusammenfassung aller bei der III. bis VI. Blutentnahme gewonnenen Werte der Gruppe 6 gegenüber allen entsprechenden Werten der Gruppe 1. Die in Vergleich zur Gruppe 6 bei der III. wie bei der IV., V. und VI. Blutentnahme beobachtete Verringerung des Effektes in Gruppe 3 könnte durch schnelleres Einsetzen der Ephedrin-Tachyphylaxie und bezw. oder durch die bei Gruppe 3 zur Zeit der Antigeninjektion geringere Ephedrinwirkung bedingt worden sein.

Beiden Ephedringruppen gehören einzelne sehr niedrige Titer zu (Tier 1 in Gruppe 3 und Tier 4 in Gruppe 6), deren Logarithmen bei 3 der 4 zur Betrachtung stehenden Blutentnahmen außerhalb des Bereiches von $\pm$ 2 s lagen. Schlösse man deswegen bei der 3. Gruppe den schlechtesten Antitoxinbildner aus und bildete das geometrische Mittel der restlichen 9 Tiere, wäre für diese Gruppe der Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe noch deutlicher. Allerdings würde man sich durch ein solches nicht das volle Versuchsergebnis berücksichtigende Vorgehen unter Umständen auch der Grundlage für weitere Aussagen begeben, wie Dittmar u. Sixel kürzlich gezeigt haben. Es stellt sich nämlich die Frage, ob nicht den nach Ephedrin beobachteten großen Differenzen zwischen größtem und kleinstem Einzelwert mehr als zufällige Bedeutung zukommt, und zwar im Sinne einer Vergrößerung der Streuung der Antitoxintiter.

Die Unterschiede zwischen den geometrischen Titer-Mittelwerten der beiden *Pilocarpingruppen* und der Kontrollgruppe waren in den einzelnen Teilserien gegenläufig und konnten in keinem Falle statistisch gesichert werden, so daß wir von den in der I. Mitteilung erörterten beiden Möglichkeiten die zweite nunmehr als besser fundiert betrachten, die Abweichungen der Mitteltiter von den Kontrollwerten also für zufallsbedingt halten. Diese Vorstellung erklärt am besten die widersprechenden Ergebnisse der Pilocarpin-Wirkung in der immunologischen Literatur.

Die *Megaphengruppe* 4 wies die geringsten Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe 1 auf. Demnach war die Verabreichung von 6mal 5 mg Megaphen pro kg Körpergewicht in 6stündigen Abständen ohne Wirkung auf die einsetzende Antitoxinbildung. Wir halten dies im Hinblick auf die gegenwärtige Diskussion der Pharmakologie dieses Phenothiazinderivates für wesentlich. Außer den bekannten Wirkungen auf die vegetativen Funktionen wird dem Megaphen ein allgemeiner peripherer Angriff an intrazellulären Fermentsystemen zugeordnet (Schaumkell). Es muß demgegenüber angenommen werden, daß Megaphen beim Kaninchen in der benützten Dosierung keine wesesentliche Störung der für die Antikörperbildung nötigen Enzyme verursacht.

Friebel u. Kästner fanden neuerdings, daß Megaphen bei täglicher Gabe in relativ kleinen Dosen die Überlebenszeit von Mäusen nach experimenteller Infektion mit Schizotryp. cruzi sehr verkürzt. Obwohl auf

den Verlauf dieser Erkrankung Immunitätsvorgänge gestaltend einwirken, konnten sich FRIEBEL u. KÄSTNER nicht dazu entscheiden, aus der Verkürzung der Überlebenszeit der mit Schizotryp. cruzi infizierten Tiere auf eine Hemmung der spezifischen Infektabwehr durch Megaphen zu schließen. Auch wir können mit unserem Ergebnis keine Stütze dafür liefern, daß die in der Literatur erwähnte megaphenbedingte Resistenzschwächung (Lit. bei FRIEBEL u. KÄSTNER, HÄNEL u. LEGATIS) auf einer Hemmung der einsetzenden Antikörperbildung beruht.

In der vorhergehenden Versuchsreihe lagen die Titer der unter Berücksichtigung der Körpergewichte hergestellten Serumgemische fast durchweg höher als die Titer der auf Grund der Körpergewichte errechneten gewogenen arithmetischen Mittel der betreffenden Einzelsera. In der vorliegenden Arbeit, bei der die Antitoxinwerte der Einzel- und Mischsera jeweils auf der gleichen Titrationsbasis bestimmt wurden, zeigten sich bei der Blutentnahme III (14 Tage nach der Immunisierung, Titrationsbasis LRm 1/30000 AE) wieder auffällige Unterschiede zwischen den Titern der Mischsera und den Mitteltitern der Einzelsera, bei den Blutentnahmen IV—VI (Basis 1/3000) dagegen nicht. Es soll in anderem Zusammenhange untersucht werden, ob das eigenartige Phänomen dadurch zustande kommt, daß Aviditätsunterschiede der Sera — die das Meßergebnis (bei gleichem Titrationsvolumen) auf geringerer Titrationsbasis (LRm 1/30000 AE) infolge der höheren Dissoziation des Toxin-Antitoxin-Komplexes stärker beeinflussen als bei Verwendung größerer Toxinmengen (LRm 1/3000 AE) — auf Grund eines von RENAUX beschriebenen Mechanismus bei der Mischung verschwinden und daß die schwach aviden Sera infolgedessen im Tierversuch höhere Wirksamkeit aufweisen.

Wie in der I. Mitteilung geschildert, traten auch diesmal bei der intracutanen Giftneutralisation von Tier zu Tier wesentlich größere Unterschiede auf als bei der Serumtitration. Die Mittelwerte der Antikörpertiter und der intracutan vertragenen Toxinmengen verliefen wiederum annähernd parallel[1].

Zusammenfassung

1. Kaninchen, die am Tage der intravenösen Immunisierung mit Diphtherie-Impfstoff einer nach 16 Std abgeschlossenen Behandlung mit 3 intravenösen Gaben von 12,5 mg pro kg *Ephedrinhydrochlorid* unterzogen wurden, zeigten in Übereinstimmung mit früheren eigenen Versuchen höhere Antitoxintiter als die unbehandelte Kontrollgruppe. Durch Ausdehnung der Behandlung und stärkere Fraktionierung der Ephedringaben konnte eine Verstärkung des Effektes nicht bewirkt werden.

2. *Pilocarpinhydrochlorid* und *Megaphen* hatten keinen nachweisbaren Einfluß auf die Di.-Antitoxinbildung des Kaninchens.

3. Manche der in der Literatur enthaltenen widersprechenden Angaben über die Beeinflussung von Immunitätsvorgängen durch vegetativ

[1] Fräulein G. WEISSBÄCKER, Frau I. ESPIG und Fräulein E. PÖTZSCH sind wir für die umfangreiche technische Mitarbeit, Fräulein E. BENN für die Unterstützung der Auswertung dankbar.

wirksame Stoffe dürften dadurch zustande gekommen sein, daß die beobachteten Effekte noch innerhalb der Streubreite normaler Verhältnisse lagen.

Literatur

Belák, S.: Klin. Wschr. **1939**, I, 472. — Dittmar, C., u. J. Sixel: Beitr. klin. Tbk. **112**, 483 (1954). — Enenkel, H. J., u. H. W. Pedal: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 69 (1955). — Engelhardt, G., u. L. Lendle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 402 (1955). — Friebel, H., u. H. Kästner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 210 (1955). — Hänel, F., u. G. Legatis: Tuberkulosearzt 8, 636 (1954). — Renaux, E.: C. r. Soc. Biol. Paris **90**, 964 (1924). — Schaumkell, K. W.: Klin. Wschr. **1955**, 282. — Stickl, H., u. A. Kerstien: Klin. Wschr. **1955**, 479. — Ungar, J.; Brit. med. J. **1955 II**, 20.

Dr. H. J. Enenkel, Staatl. Anstalt f. experimentelle Therapie, „Paul-Ehrlich-Institut", Frankfurt am Main

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 149—160 (1955)

Aus der Dermatologischen Universitäts-Klinik (Direktor: Prof. Dr. A. Marchionini)
und der I. Medizinischen Universitäts-Klinik München
(Direktor: Prof. Dr. K. Bingold †)

Beziehungen zwischen Hyaluronidasehemmung und der anticoagulierenden Wirksamkeit von Heparinen und Heparinoiden

Von

P. van Caneghem, R. Marx und H. W. Spier

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Juli 1955)

In Fortführung unserer früheren Untersuchungen[4] wurden zunächst weitere Substanzen auf Hyaluronidase (H'ase)-Hemmwirkung im Viscositätsminderungstest geprüft.

Methodik

Als Aktivitätstest der Hyaluronidase (H'ase) wählten wir, wie früher[4], die viscosimetrische Methode, bei der die Auslaufzeit einer definierten Mucinlösung unter dem Einfluß einer bestimmten H'ase-Konzentration gemessen wird. Das Mucin wurde aus Nabelschnüren* nach Meyer und Palmer hergestellt. Die Extraktionsflüssigkeit wurde jetzt auf ein p_H von 5,8—6,2 eingestellt (früher[4] 9,2), da bei diesem p_H weniger Verunreinigungen mitextrahiert werden. Wir lösten, wenn nicht anders angegeben (s. Tab. 1—4), 10 mg der zu prüfenden Substanz in dem Mucin-H'ase-Ansatz (0,2% Mucin in 0,9% NaCl-isotonem Phosphatpuffer p_H 7 $\overline{aa}$ gelöst. Hiervon je Ansatz 4 cm^3 + 4 cm^3 H'ase (Luronase-Bayer 10 E/cm^3). Einzelheiten siehe [4].

Als Kriterien einer „kompletten Hemmung" wurde eine nach 20 min gleichbleibende Auslaufsgeschwindigkeit angesehen, als Kriterium einer inkompletten Hemmung eine mehr oder weniger ausgeprägte Verlangsamung der ohne Hemmsubstanz beobachtbaren H'ase-bedingten Zunahme der Auslaufsgeschwindigkeit (Abb. 4).

Die frühere[4] Untersuchung zahlreicher (Farb)-Stoffe hatte gewisse Beziehungen zwischen H'ase-Hemmwirkung und Molekulargewicht ergeben, insbesondere zu der Anzahl von Sulfonsäure- bzw. aromatischen OH-Gruppen. Als Beispiel sei die Hemmwirkung von Trypanblau und Anthracenblau genannt. Wir können diese empirische Regel, welche die von Werle formulierte Hypothese von der Bedeutung funktionell basisch reagierender OH-Gruppen im H'ase-Molekül unterstützt, an einigen weiteren Substanzen erhärten (s. Tab. 1—4).

* Wir danken der II. Universitäts-Frauenklinik (Direktor: Prof. Dr. Fikentscher) für Überlassung des Materials.

Tabelle 1. *Hyaluronidase-Hemmwirkung verschiedener Substanzen*

Substanz	Zusatz zu 8 cm³ Mucin-H'ase-Ansatz mg	H'ase-Hemmwirkung	Bemerkungen
Phosphorwolframsäure	10	komplette Hemmung	
Wolframat (Na)	10	keine Hemmung	
Phosphormolybdänsäure	10	keine Hemmung	
Molybdat (Na)	10	keine Hemmung	
Hexametaphosphat (Na)	10	keine Hemmung	
Laurylsulfonat (Na)	10	komplette Hemmung	siehe [2]
Rei (Waschmittel)	10	partielle Hemmung	enthält Fettalkoholsulfonate[2]
Thiazol gelb	10	komplette Hemmung	sulfonierter saurer Farbstoff
Isaminblau	10	komplette Hemmung	
Coriphosphin	10	fällt Mucin	
Gallussäure	10	keine Hemmung	
Tannin	10	komplette Hemmung	fällt H'ase aus
Polyphloretinphosphat[1]	10	komplette Hemmung	*keine* sichtbare Präcipitation von H'ase
Mercurichlorid	8	partielle Hemmung	siehe Text

[1] Uns freundlicherweise von der Firma Hoechst/Frankfurt am Main zur Verfügung gestellt.

Hingewiesen sei z. B. auf die Unwirksamkeit des Citrins, welches Hesperidin und Eriodictin enthält — beide besitzen nur 2 OH-Gruppen je Molekül — im Vergleich zur Hemmwirkung des Citrins E (d-Epicatechin mit 5 OH-Gruppen im Molekül) (Tab. 3). — Weiteres Beispiel: Hemmwirkung des Adrenalins (3 OH-Gruppen je Molekül), keine Hemmwirkung des Ephedrins und des Sympatols mit nur 1 bzw. 2 OH-Gruppen (Tab. 2).

Keine H'ase-Hemmung zeigten folgende, nicht in die Tabellen aufgenommene Stoffe: Agar-Agar, Gelatine, KCN, 1,5-Naphtholdisulfonsäure, Naphthoresorzin, α-Naphthol-β-Sulfonsäure, p-Toluolsulfonsäure, Vitamin B_1, B_{12} (letzteres 5 mg-Zusatz).

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen stehen Literaturangaben, nach denen unspezifisch H'ase-inhibierende Substanzen vorzugsweise unter relativ großmolekularen Verbindungen mit Phosphorsäure-Sulfonsäure- oder OH-Gruppen zu suchen sind[2, 7, 8, 11, 15, 26]. Nach L. Hahn u. Mitarb. sind antihyaluronidatisch wirksame, für Ratten nur wenig toxische Substanzen durch Polymerisierung von Diphenyl- und Triphenylmethanderivaten zu erhalten ([8, 12, 13, 14]).

Bekanntlich zeigen *Heparine* (Hpe) neben ihren anticoagulierenden Eigenschaften auch H'ase-hemmende Wirksamkeit ([9, 18, 19, 24]). Letztere ist allerdings, zumindest in vitro, nicht stark ausgeprägt. Da die verschiedenen Hpe und Heparinoide (Hpde) bedeutende quantitative Unter-

Tabelle 2. *Hyaluronidase-Hemmwirkung von physiologischen Substanzen und Pharmaka*

Substanz	Zusatz (s. Tab. 1)	H'ase-Hemmwirkung	Bemerkungen
Acetylcholin	10 mg	ohne Wirkung	
Adenosin-5-Phosphorsäure	10 mg	keine Hemmung	
Adrenalin	4 mg	leichte Hemmung	
Ascorbinsäure	10 mg	partielle Depolymerisation	siehe [5]
Butazolidin	10 mg	ohne Wirkung	
Ephedrin	10 mg	ohne Wirkung	
Gentisinsäure	10 mg	ohne Wirkung	
Irgapyrin	10 mg	ohne Wirkung	
Nicotinsäureamid	10 mg	partielle Hemmung	
Streptokinase + Streptodornase (Lederle)	104000 bzw. 43000 E	depolymerisiert Mucin	durch Zusatz von 10 mg Germanin teilweise Hemmung
Sympatol	10 mg	ohne Wirkung	
Tibatin	10 mg	ohne Wirkung	44'-Diaminodiphenylsulfon-Galaktosid
Venostasin	0,5 cm³	ohne Wirkung	durch Cholesterinzusatz entgifteter Roßkastanienextrakt mit Vit. B_1-Zusatz

Tabelle 3. *Hyaluronidase-Hemmwirkung verschiedener Substanzen mit Vitamin P-Wirkung*[2, 26]

Substanz	chemische Konstitution	Zusatz (s. Tab. 1) mg	H'ase-Hemmwirkung	Bemerkungen
Citrin[1] (Hoechst)	Flavanonderivat (Hesperidin, Eriodictyolglycosid)	10	ohne Wirkung	
Citrin *E*[1, 3] (Hoechst)	d-Epicatechin	10	teilweise Hemmung	
Hesperidin (Promonta)	phosphoryliertes Hesperidin	10	teilweise Hemmung	weniger aktiv als Citrin E
Birutan (Merck)	Na-Salz des Rutinsulfats	10	teilweise Hemmung	weniger aktiv als Hesperidin
Adrenoxyl[2] (Labaz)	Adrenochrom-monosemicarbazon	2,5	ohne Wirkung	

[1, 2] Wir danken den Farbwerken Hoechst[1], sowie der Firma Nordmark[2] für die Überlassung der Präparate.

[3] Ein älteres Citrin E-Präparat war ungefähr 10mal mehr aktiv als dieses (ungefähr ½ mal so aktiv wie Germanin).

Tabelle 4. *Hyaluronidase-Hemmwirkung von Heparin und Heparinoiden*[9, 18, 19, 24] *anderen Anticoagulantien und Dextran*

Substanz	chemische Konstitution	Zusatz (s. Tab. 1)	H'ase-Hemmwirkung	Bemerkungen
Liquemin . . . (La Roche)	α-Heparin	5000 E[1] (38,5 mg)	teilweise Hemmung	H'ase-Inhibition schwach gegenüber Germanin
Heparin. . . . (Novo)	α-Heparin	5000 E/50 mg	teilweise Hemmung	
Thrombophob . (Nordmark)	α-Heparin	5000 E/50 mg	teilweise Hemmung	
Pularin . . . . (Evans)	α-Heparin	5000 E/40 mg	teilweise Hemmung	
Thrombovetren (Promonta)	α-Heparin	5000 E/47,85 mg	teilweise Hemmung	
Labor-Standard-Heparinoid . . (R. Marx)		10 mg	teilweise Hemmung	Heparinoid
Thrombocid . .	sulfoniertes Polysaccharid	10 mg	teilweise Hemmung	Heparinoid
Thrombostop . (Turon)	Na-polygalakturonsulfonat	40 mg	keine Hemmung	Heparinoid
Dextransulfat .		10 mg	teilweise Hemmung	Heparinoid
Dextran . . .	Polysaccharid	10 mg	keine Hemmung	keine anticoagulierende Wirkung
Thrombodym . (Auergesellschaft, Berlin)	Neodymsulfoisonicotinat	10 mg	keine Hemmung	Anticoagulans
Marcumar . . (La Roche)	3-(1′-Phenylpropyl)-4-oxycumarin	10 mg	teilweise Hemmung	indirekt wirkendes Anticoagulans vom Cumarintyp
G 23350. . . . (Geigy)	Cumarinderivat	10 mg	teilweise Hemmung	Anticoagulans vom Cumarintyp

[1] Biochem. Z. **325**, 366 (1954) (Tab. 3, S. 370). Druckfehler: für Heparin (Liquemin) war als Dosis 100 mg statt 100 E angegeben.

schiede untereinander hinsichtlich ihrer anticoagulierenden Wirksamkeit aufweisen, prüften wir, ob dasselbe auch für ihre H'ase-Inhibitionseigenschaften gilt. Tab. 4 zeigt, daß die verschiedenen im Handel verfügbaren α-Heparine eine etwa gleichstarke H'ase-Hemmaktivität besitzen, diejenige der Hpde jedoch variiert.

Fermentkinetische Untersuchungen

Um den Charakter der H'ase-Hemmwirkung von Hp. und Hpden untereinander und mit der von anderen Substanzen vergleichen zu können, wurde der Inhibitionsgrad als Funktion der Konzentration des Inhibitors bestimmt.

In ein Koordinatensystem wird die Auslaufszeit als Funktion der Zeitintervalle zwischen Ausgangspunkt der Messungen und der jeweiligen Meßzeit eingetragen, wobei eine Kurve resultiert, die man unter unseren Versuchsbedingungen annähernd als eine Hyperbel bezeichnen kann (Abb. 4).

E = Auslaufszeit

E_o = Auslaufszeit zur Zeit 0, d. h. der unveränderten Mucinlösung.

E_c = Auslaufszeit nach totaler Depolymerisation des Mucins.

E_t = Auslaufszeit zur Zeit t.

Bezeichnet man $E_o - E_c$ als M_o und $E_t - E_c$ als M_t, so gilt:

$$M_t = \frac{M_o K}{t + K} \tag{1}$$

K ist eine Konstante.

Die Ableitung von M_t nach t gibt uns die Geschwindigkeitsabnahme (v) der Auslaufszeit

$$v = \frac{-M_o K}{(t+K)^2}, \tag{2}$$

die maximale Geschwindigkeit bei $t = 0$ ist

$$v_o = -\frac{M_o}{K}. \tag{3}$$

Der Quotient der Geschwindigkeit mit zugesetzter Hemmsubstanz zu der ohne Hemmsubstanz bei gleicher Auslaufszeit gibt ein Maß der H'ase-Aktivitätshemmung der betreffenden Hemmsubstanz:

$$\alpha = \frac{v'}{v} \tag{4}$$

v' = Geschwindigkeitsabnahme *mit*, v = *ohne* Inhibitor.

Die Hemmwirkung kann auch in Prozenten ausgedrückt werden:

$$y = 100\,(1 - \alpha) \tag{5}$$

y = prozentueller Inhibitionsgrad.

Das Ausmaß der Hemmung der verschiedenen Substanzen kann so leicht in seiner Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration dargestellt werden und die einzelnen Inhibitionen in bezug auf ihre spezifischen Aktivitäten untereinander verglichen werden.

Wenn man als Ordinate des $\log \frac{1}{\alpha + 0{,}1}$ und als Abszisse $\log 100\ \mathrm{I}$ wählt, wobei I die Konzentration des betreffenden Inhibitors bedeutet, so lassen sich die Meßpunkte in guter Annäherung jeweils auf einer Geraden einordnen.

Mathematisch dargestellt erhält man:

$$\log \frac{1}{\alpha + 0{,}1} = A \log 100\,\mathrm{I} + B \tag{6}$$

wobei A und B Konstanten sind.

Wird in ein solches logarithmisches System die Hemmungsaktivität verschiedener von uns untersuchter Substanzen in bezug auf die

Konzentration des Hemmkörpers eingetragen, so können die erhaltenen Geraden (Abb. 1) nach 2 Gesichtspunkten geordnet werden:

a) Die *relative* Hemmwirkung der geprüften Substanzen bei Zufügung gleicher Mengen ist, wie schon aus Tab. 1—4 ersichtlich, sehr unterschiedlich [Variation der Konstante B (Gleichung 6)].

b) Diese Geraden (Abb. 1) lassen sich ferner nach einem weiteren Gesichtspunkt, nämlich nach dem unterschiedlichen Grad ihrer Steigung (Konstante A = Winkel zur Abszisse) in 2 Gruppen einteilen und zwar 1. solche mit starker Steigung; dazu gehören die Geraden von Germanin,

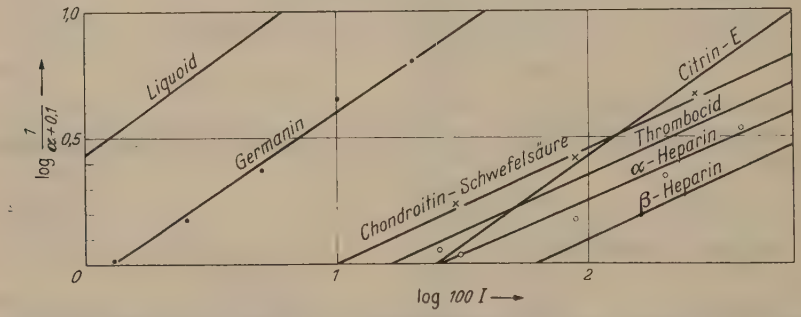


Abb. 1. Inhibitionsgrad als Funktion der Inhibitorkonzentration einiger Substanzen. Einzelmeßpunkte wurden nur für Germanin (· · ·), Chondroitinschwefelsäure (× × ×) und α-Heparin (o o o) eingetragen. Für Germanin und α-Heparin stellen diese Punkte gemittelte Werte von mehreren Messungen dar. — An der Ordinate ist 1 = 100% Inhibition und 0 = 10% Inhibition. An der Abszisse ist 1 = 0,1 mg/cm³ und 2 = 1 mg/cm³

Liquoid. Zur Gruppe 2 mit geringer Steigung, d. h. zu Inhibitoren, deren Konstante A (Gleichung 6) kleiner ist, gehören α- und β-Heparin, Thrombocid, Chondroitin-Schwefelsäure usw. In jeder von diesen 2 Gruppen sind die Geraden untereinander in etwa parallel.

Bei den Heparinen konnten die Messungen nur bei niedrigen Hp-Konzentrationen durchgeführt werden, da hohe Konzentrationen wegen der geringen Aktivität dieser Substanzgruppe zu große (teure!) Heparinmengen usw. erfordert hätten. Auch wären bei höheren Konzentrationen viel ungenauere Ergebnisse infolge der Viscositätserhöhung durch die Hpe selbst zu erwarten gewesen. Die oberen Teile der Kurven sind aus diesen Gründen extrapoliert.

Die geprüften Substanzen der beiden genannten Gruppen zeigen offensichtlich einen unterschiedlichen Inhibitionsmodus. Die Differenz des Verhaltens der betreffenden Kurvenscharen bei maximaler und minimaler Aktivität scheint sich jedoch nicht auf die Formel: kompetitiv oder nicht kompetitiv bringen zu lassen.

Die früher mit Tropäolin 000 Nr. 2[4] durchgeführten Inhibitionsversuche erstreckten sich jetzt auch auf Germanin und Chondroitin-Schwefelsäure. Versuche mit breiterer Variation der Substratkonzentration zeigten, daß der Inhibitionsgrad wenigstens für Tropäolin 000 Nr. 2, Ger-

manin und Chondroitin-Schwefelsäure nicht, wie früher für Tr. 000 Nr. 2 angenommen, unabhängig ist von der Substratmenge, sondern kleiner wird bei Größerwerden derselben. Diese 3 Substanzen, ihrerseits Vertreter *beider* obengenannten Gruppen sind demnach Inhibitoren 1. Ordnung nach L. Michaelis u. Menten. Worauf die in Abb. 1 und 2 zum Ausdruck kommenden unterschiedlichen Hemmungstypen beruhen, ist noch ungeklärt.

Darüber hinaus können nicht etwa alle H'ase-Inhibitoren diesen beiden Hemmtypen (Germanin und Chondroitin-Schwefelsäure) zugeordnet werden; *Tannin* z. B., ein sehr wirksamer Inhibitor — ungefähr 20—30fach aktiver als Germanin — fällt H'ase bei genügend hoher Konzentration aus. Wenn man analog zur Abb. 1 den Inhibitionsgrad des Tannins in bezug auf die Konzentration des Inhibitors einträgt, resultiert keine lineare Funktionskurve (Abb. 3).

Ferner: *Mercurichlorid*, das etwa 10mal weniger hemmt als Germanin, blockiert im Gegensatz zum Germanin wahrscheinlich direkt das Substrat, offenbar durch nicht durch Dialyse aufhebbare Anlagerung: Bei Dialyseversuchen mit Cellophanmembranen passiert Hg aus $HgCl_2$-Lösungen die Membran; Quecksilber ist im Dialysat jedoch nicht mehr (als HgS) nachweisbar, wenn zur $HgCl_2$-Lösung Mucin hin-

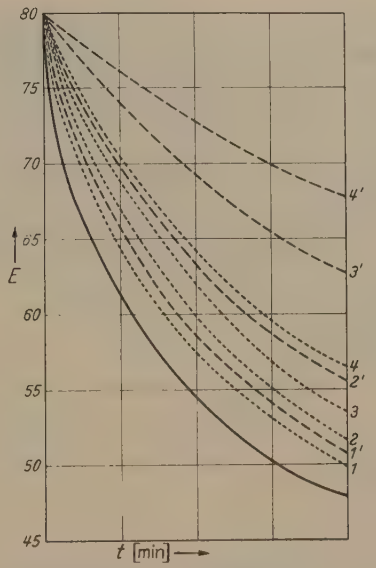


Abb. 2. Hemmwirkung von α-Heparin und Germanin auf das H'ase-Mucin-System. Bei geometrisch steigenden Konzentraitonen gleichen Progressionsfaktors. E = Auslaufzeit in $^1/_{100}$ min, t = Zeit ab Reaktionsbeginn in min

ohne Inhibitor ——
mit Heparin ------
1 = 0,25 mg/cm³ 2 = 0,5 mg/cm³
3 = 1,0 mg/cm³ 4 = 2,0 mg/cm³
mit Germanin — — —
1′ = 0,0125 mg/cm³ 2′ = 0,025 mg/cm³
3′ = 0,05 mg/cm³ 4′ = 0,1 mg/cm³

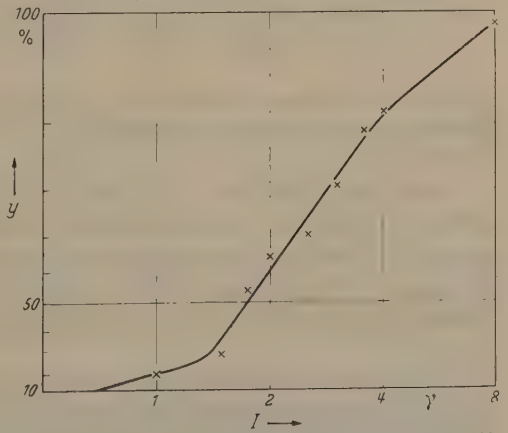


Abb. 3. Inhibition des H'ase-Mucin-Systems durch Tannin. Inhibition (y) als Funktion der Inhibitorkonzentration (I). Logarithmische Skala. Statt log $\frac{1}{\alpha + 0{,}1}$ in der Ordinate und log 100 I (Abszisse) wurden hier zwecks besserer Anschaulichkeit direkt die korrespondierenden Werte von y und I in logarithmischer Skala eingetragen

zugefügt wird. Hinsichtlich Tropäolin 000 Nr. 2 wurde dagegen das Gegenteil beobachtet[4], d. h. der Farbstoff dialysierte bei Mucinzusatz zu der Farbstofflösung schneller. Beim Vergleich partieller Inhibitionskurven mit Germanin und $HgCl_2$ fällt auf, daß die Kurven sich nach einem gewissen Zeitraum kreuzen (Abb. 4). Die Viscosität der Mucinlösung mit Germaninzusatz nimmt zwar nur langsam ab, nähert sich aber schließlich der Asymptote des Mucin-H'ase-Ansatzes ohne Inhibitorzusatz, während die Mucin-Sublimatkurve einer höhergelegenen Asymptote zustrebt.

Nach Marbet u. Winterstein wird die Antithrombin-Aktivität der α-Heparine von der Inkubationszeit mit Plasma beeinflußt. Wir selbst konnten keine Vermehrung der H'ase-Inhibition durch α-Heparine (Liquemin Roche und Thrombophob Nordmark) beobachten, weder sofort bei Zusatz von Citrat- oder Oxalatplasma, noch nach halbstündiger Inkubation bei 37°.

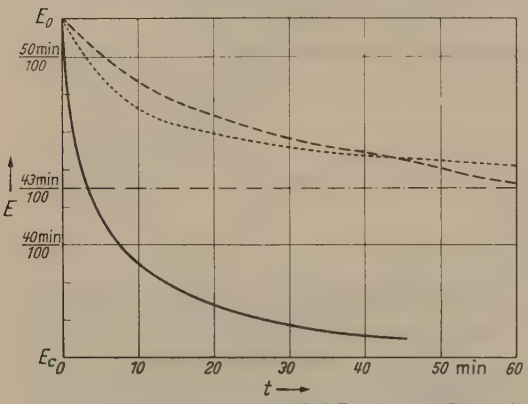


Abb. 4. Mucindepolymerisierung bei Zusatz von Germanin und $HgCl_2$. Während die $HgCl_2$-Kurve asymptotisch die Auslaufszeit $E = {}^{43}/_{100}$ min erreicht, nähert sich die Viscosität des Mucin-H'ase-Ansatzes bei Germaninzusatz asymptotisch der E des erschöpfend depolymersierten Mucins. —— ohne Inhibitor; · · · · mit $HgCl_2$; – – – – mit Germanin; —·—·—·— Asymptote des Mucin-H'ase-Ansatzes bei $HgCl_2$-Zusatz

H'ase-Hemmung und anticoagulierende Wirkung

Nach Winterstein dürfte sowohl Molekülgröße wie Zahl der Sulfatreste bei der Gesamtgruppe der *Anticoagulantia vom Heparintyp* eine determinierende Rolle für die antithrombotische Wirksamkeit spielen. Offensichtlich gilt das auch für die H'ase-Hemmung der betreffenden Substanzen[24]. Dextran wirkt z. B. weder anticoagulierend noch H'ase-H'asehemmend, Dextransulfat andererseits ist sowohl ein Anticoagulans- wie ein Hemmer.

Wir untersuchten nun, inwieweit diese beiden Eigenschaften *quantitativ* parallel laufen. Ergebnisse siehe Tab. 5, in der die H'ase-Hemmwirkung in Vergleich zu der anticoagulierenden Aktivität (bestimmt von R. Marx) eingetragen ist. Die Zahlenwerte wurden durchgehend für beide Meßreihen auf ein Labor-Standardheparinoid (Wirksamkeit = 1 gesetzt) bezogen.

Wie ersichtlich, besteht kein Parallelismus zwischen H'ase-Inhibition und anticoagulierender Wirkung (bei Zugrundelegung der herangezogenen Tests). Dies gilt insbesondere für die Heparinoide.

Neben Hpen und Hpden wurde das aromatische Polyphenol *Anthracenblau* geprüft, das reich an OH-Gruppen ist, jedoch keine Sulfatgruppen in seinem Molekül enthält. Dem Anthracenblau kommt offensichtlich eine gewisse anticoagulierende Wirkung, etwa von der Größenordnung der des Germanins zu.

Unsere Ergebnisse bestätigen die wiederholt vertretene Ansicht (s. o.), wirksame H'ase-Inhibitoren seien vor allem unter höhermolekularen Substanzen mit Phosphorsäure-, Sulfonsäure-, Schwefelsäureester- oder OH-Gruppen zu vermuten. Aber der Vergleich des H'ase-Inhibitions-

Tabelle 5. *Vergleich der relativen Hyaluronidase-Inhibition mit der relativen anticoagulierenden Wirksamkeit (im Thrombinzeit- und Prothrombinzeit-Test) von Heparinen und Heparinoiden (bezogen auf die Aktivität eines Labor-Standard-Heparinoids, dessen anticoagulierende Aktivität 1 angesetzt wurde)*

Substanz	Hersteller	H'ase-Hemmwirkung	Anticoagulanswirkung[4] in der a) 2. Phase	b) 1. Phase
α-Heparin[1]	La Roche	½	1½	1½
β-Heparin[1]	La Roche	¼	< ½	< ½
Chondroitinschwefelsäure[1]	La Roche	2½	fast 0	fast 0
Chondroitinpolyschwefelsäureester[1]	La Roche	1	< 1/10	< ¼
Pektinsäurepolyschwefelsäureester („Mepesulfat")[1]	La Roche	⅓	< 1/20	¼
Liquoid[1]		40	> 2	1½
Labor-Standard-Heparinoid (R. Marx)[3]		1	1	1
Thrombocid[2]	W. Benend, München-Solln	1	< ½	> ½
SP 54[2]	W. Benend, München-Solln	1	< ½	~ ½
Ester 55[2]	W. Benend, München-Solln	¼	< 1/15	< 1/30
Germanin	Bayer	25	< 1/10	~ 1/15
Anthracenblau	Grübler	~ 35	< 1/10	~ 1/20

[1] Wir danken der Firma Hoffmann-La-Roche, Grenzach/Baden, sowie [2] der Firma Dr. W. Benend, München-Solln, für die freundliche Überlassung der Präparate.

[3] Das Labor-Standard-Heparinoid hatte ein Molekulargewicht von 16000, drehte die Ebene des polarisierten Lichtes nach links, und ergab bei einer Viscosität von 0,230 (bei 25° C in 2%iger Lösung) positive Farbreaktionen auf Glucuronsäure (nach Dische) und auf Glucosamin (nach Grassmann-Janicki).

[4] Die Angaben auf Anticoagulanswirkung sind größenordnungsmäßige, weil Differenzen im Kurvenverlauf in verschiedenen Testsystemen den Vergleich von Heparinen und Heparinoiden, sowie von Heparinoiden untereinander erschweren (Conf. R. Marx, Thromboemboliekongreß, Basel, 1954).

ausmaßes verschiedener Substanzen bei Einbeziehung der Anticoagulantia (Tab. 4) ergibt, daß die genannten Bauprinzipien die Hemm-Aktivitäten keineswegs restlos determinieren.

So übt α-Heparin mit seinen im Vergleich zum Thrombozid viel größerem Molekül (16000[29] bzw. < 5000) bei ungefähr identischem Schwefelgehalt eine geringere H'ase-Inhibition aus als Thrombozid [vgl. auch Husemann u. Pfannemüller, Z. Naturforschung **10b**, 143—150 (1955)].

Zur Diskrepanz zwischen in vitro- und in vivo-Hemmung der H'ase

Die wohl am häufigsten angewendeten Methoden bei H'ase-Studien dürften (in vitro) viscosimetrische Messungen sowie in vivo-Bestimmung der Ausbreitung meist farbstoffmarkierter Hautquaddeln sein. Beim Vergleich der Ergebnisse dieser beiden Methoden findet man teils mehr oder weniger sich deckende Ergebnisse, teils aber auch beträchtliche Diskrepanzen. Unter unseren in vitro-Bedingungen erwies sich z. B. Cortison als H'ase-indifferent[4], ebenso Venostasin (Tab. 2), im Gegensatz zu in vivo-Ergebnissen[3, 11].

Hinsichtlich dieser Diskrepanz dürften folgende Erklärungsmöglichkeiten zu bedenken sein:

1. Methodische Fehler.

2. Umwandlung der in vitro nicht hemmenden Substanz in vivo zu einem H'ase-hemmenden Produkt bzw. Aufhebung der in vitro-Inhibition durch Serum- und Gewebseiweiße usw.

3. Reaktive Ausschüttung von H'ase-Inhibitoren nach Zufuhr der betreffenden in vitro nicht hemmenden Substanz.

4. Fehlinterpretation der Befunde, d. h. scheinbare in vivo-Hemmeffekte haben mit dem H'ase-System nichts zu tun.

Auf 1. wurde schon früher hingewiesen[4]. Bei der Verwendung von *Farbstoffen zur Sichtbarmachung des Ausbreitungsfeldes bei Quaddelversuchen* ist, falls H'ase und Farbstoff gleichzeitig injiziert werden, letzterer vorher auf Hemmwirkung zu prüfen.

Die unter 4. genannte Möglichkeit wird durch folgende eigene Modellversuche beleuchtet:

a) Einfache Diffusionshemmung ohne Beteiligung des H'ase-Systems.

Bei Überschichtung einer 5%igen Gelatinesäule mit wäßrigen Lösungen eines basischen Farbstoffs, z. B. Methylenblau, wird eine geringere Eindringungsgeschwindigkeit der gefärbten Lösung bei Zufügung von Heparin beobachtet. Offensichtlich handelt es sich um eine elektrostatische Bindung von Methylenblau an die großen, weniger beweglichen Moleküle des Heparins.

b) H'ase-unabhängige Beeinflussung der Membrandiffusion.

Mißt man nach Day die Geschwindigkeit, mit der die Aponeurose der Bauchwand der Ratte als Membran eine Tyrodesäule passieren läßt und beschickt eine solche Membran mit *Liquemin* (= α-Heparinlösung), so nimmt die Menge der passierenden Flkt. vorübergehend ab. Eine in bezug auf in vitro-H'ase-Inhibition gleichstarke Lösung von Germanin hat dagegen keinerlei bremsende Wirkung. Es handelt sich, wie Day für das Amidon zeigen konnte, offenbar um eine partielle Obstruktion des Gewebsfilters durch die relativ großen Heparinmoleküle. — *Thiazolgelb* andererseits tritt sehr langsam durch die Rattenaponeurose hindurch wegen Bildung kolloidal-viscöser Lösungen in Gegenwart der Ca- und Mg-Ionen der Tyrodelösung.

Angesichts dieser einfachen Modellbeispiele sind bei in vivo-Versuchen Interferenzmöglichkeiten einer Reihe von Faktoren bei Diffusionsphänomen gefärbter Lösungen und bei Gewebspassagen von Flüssigkeiten zu bedenken. Solche Faktoren können die Resultate von Hemmstudien unter derart komplexen Bedingungen unter Umständen verfälschen. Dies ist um so eher zu vermuten, als z. B. die H'ase-Inhibition durch Heparin in vitro nur schwach ausgeprägt ist. Es erscheint jedenfalls durchaus fraglich, ob gewisse in vivo-Effekte des α-Heparins, die bisweilen als Beweis einer H'ase-inhibitorischen Wirksamkeit des Heparins angesehen wurden, in Wirklichkeit auf H'ase-Inhibition beruhen.

Zusammenfassung

1. Es werden in Fortsetzung früherer Untersuchungen weitere Beispiele für die Bedeutung saurer Gruppen für die Hyaluronidase-Inhibition u. a. durch „Vitamin-P"-Faktoren sowie durch Heparine und Heparinoide gebracht.

2. Die Überprüfung der Reaktionskinetik einiger Hemmsubstanzen legt — in Abweichung von unserer früheren Auffassung — die Deutung der H'ase-Inhibition bevorzugt als die einer Hemmung *erster* Ordnung (kompetitiv) nach Michaelis u. Menten nahe, ferner die Annahme unterschiedlicher Hemmungstypen.

3. Ein engerer Parallelismus zwischen H'ase-Inhibition und anticoagulierender Wirksamkeit der Heparine und Heparinoide besteht unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen nicht.

4. Auf die Schwierigkeiten einer Übertragung von in vitro-H'ase-Hemmphänomenen auf in vivo-Verhältnisse wird an Hand von Modellversuchen hingewiesen.

Literatur

[1] Altenburg, H., R. Brinkman, W. Heerspink and R. Scheuermann: Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wetensch., Series B, **56**, 385 (1953). — [2] Beiler, J., and G. Martin: J. of Biol. Chem. **174**, 31 (1948). — [3] Bourel, M.: In Les Réactions organiques non spécifiques en Dermatologie, p. 204, Masson 1952. — [4] van Caneghem, P., u. H. W. Spier: Biochem. Z. **325**, 366 (1954). — [5] Daubenmerkl, W.: Acta pharmacol. (Kopenh.) **1951**, 153. — [6] Day, T.: J. of Physiol. **117**, 1 (1952). — [7] Diezfalusy, E., O. Ferno, H. Fex, B. Högberg, T. Linderot and Th. Rosenberg: Acta chem. scand. (Copenh.) **7**, 913 (1953). — [8] Fabinyi-Syebehely, M., L. Hahn and J. Syebehely: Brit. J. Pharmacol. **8**, 30 (1953). — [9] Ferrari, W., E. Costa e P. Pelegrini: Arch. di Sci. biol. **33**, 48 (1949) zit. nach Meyer, K., u. M. Rapport. — [10] Gibian, H.: Ergebn. Enzymforsch. **13**, 1 (1954), — [11] Gigglberger, H., u. F. Kleibel: Klin. Wschr. **1953**, 475. — [12] Hahn, L.: Nature (Lond.) **170**, 282 (1951). — [13] Hahn, L., and J. Fekete: Acta chem. scand. (Copenh.) **7**, 798 (1953). — [14] Hahn, L., and E. Frank: Acta chem. scand. (Copenh.) **7**, 806 (1953). — [15] Jensen, R., O. Snellman and B. Sylvén: J. of Biol. Chem. **174**, 265 (1948). — [16] Korting, G. W.: Hautarzt **4**, 493 (1953). — [17] Marbet, R., u. A. Winterstein: Helvet. physiol. Acta **10**, 528 (1952). — [18] McClean, D.: J. of Path. **34**, 459 (1942), zit. nach Meyer, K., u. M. Rapport. — [19] Meyer, K.: Physiologic. Rev. **27**, 335 (1947) zit. nach Meyer, K., u. M.

Rapport. — [20] Meyer, K., and J. Palmer: J. of Biol. Chem. **107**, 629 (1934), **114**, 689 (1936). — [21] Meyer, K., and M. Rapport: Adv. Enzymol. **13**, 199 (1952). — [22] Michaelis, L., u. M. Menten: zit. nach Flaschenträger: Physiol. Chemie, I. Die Stoffe. Springer 1951. — [23] Miller, W., and A. Dessort: zit. nach Meyer, K., u. M. Rapport. — [24] Pantilitschko, M., u. E. Kaiser: Biochem. Z. **322**, 137 (1951). — [25] Preston, R., S. Avakian, J. Beiler, J. Moss and G. Martin: Exper. Med. a. Surg. **11**, 1 (1953). — [26] Rodney, G., A. Swanson, L. Weeler, G. Smith and C. Worrel: J. of Biol. Chem. **183**, 739 (1950). — [27] Vincent, D., et G. Segonzac: C. r. Soc. Biol. (Paris) **147**, 1776 (1953). — [28] Werle, E., F. Turtur u. R. Bauereis: Biochem. Z. **319**, 337 (1949). — [29] Winterstein, A.: Centenaire de l'Institut national genevois, volume hors-série 1954 p. 93. Symposium sur les Macromolécules.

Dr. P. van Caneghem, Priv.-Doz. Dr. H. W. Spier,
Dermatologische Universitätsklinik, Frauenlobstraße 9,
Priv.-Doz. Dr. R. Marx, I. Med. Univ.-Klinik, München, Ziemssenstraße 1

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 161—168 (1955)

Aus der Medizinischen Universitätsklinik, Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. R. Schoen)

Über das Verhalten von Lipiden und Fermenten in der Leber bei langdauernder Cholesterinfütterung*

Von
Hans-Ludwig Krüskemper und Günter Schulze

(Eingegangen am 3. August 1955)

In der vorausgegangenen Mitteilung (Krüskemper u. Schulze, 1954) über Veränderungen der Serumlipide, Serumeiweiße und -Fermente bei experimenteller Atherosklerose kamen wir zu dem Schluß, daß sie Ausdruck einer tiefgreifenden Fettstoffwechselstörung seien. Es wurde die Vermutung geäußert, daß die Leber an diesen Veränderungen nicht unbeteiligt ist. In der vorliegenden Arbeit sollen die von uns an der Leber unter den gleichen experimentellen Bedingungen wie am Serum erhobenen Befunde mitgeteilt werden. Diese Untersuchungen hatten zum Ziel festzustellen, ob auf Grund der Befunde an der Leber Anhaltspunkte für die Genese der Serum- bzw. später zu beschreibenden Aortenveränderungen gewonnen werden können.

Methodik

Als *Versuchstiere* dienten Kaninchen beiderlei Geschlechts mit einem Durchschnittsgewicht von 2910 g (2200—3700 g), die bei normaler Mischkost gehalten wurden.

Hinsichtlich der Durchführung der *Cholesterinfütterung* (1 g Cholesterin/Tier/Tag, bis zu 89 Tagen) siehe Krüskemper u. Schulze (1954).

Die *Lipidfraktionen* der Leber wurden adsorptionschromatographisch getrennt und gravimetrisch bestimmt (Kathen, 1949; Schulze u. Südhof, 1953).

Die Aktivität der *Cholinesterase* im wäßrigen Lebervollhomogenat (10%; 0,5 ml/Ansatz) wurde manometrisch nach Ammon (1933) ermittelt. Temperatur: 37,5°. Versuchszeit 30 min. Aktivitätsangabe: Kubikmillimeter CO_2-Entwicklung/mg Trockengewebe/30 min. Substrat: Benzoylcholinchlorid, Endkonzentration im Ansatz: 10^{-2} m.

Die *Tributyrinspaltung* im Leberhomogenat (10%; 0,5 ml/Ansatz) wurde ebenfalls manometrisch an Leberschnitten gemessen. Ansatz wie bei Bestimmung der Cholinesterase. Tributyrin-Endkonzentration: 10^{-3} m. Aktivitätsangabe: Kubikmillimeter CO_2-Entwicklung/mg Trockengewebe/15 min.

Die Aktivitätsbestimmung der sauren und der alkalischen *Phosphatase* im Homogenat geschah in Anlehnung an die Methoden von Kirberger u. Martin. Aktivitätsangaben in Gutman- bzw. King-Armstrong-Einheiten/mg Trockengewebe.

* Durchgeführt mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Die *Gewebsatmung* der Leber wurde manometrisch nach Warburg ermittelt. Milieu: Ringer-Phosphat-Lösung mit 0,2% Glucose, p_H 7,2. Temperatur: 37,5°. Versuchszeit 60 min. Gewebstrockengewicht: etwa 25 mg/Ansatz.

Bei der *statistischen Auswertung* der Ergebnisse benutzten wir die bei Pätau angegebene Methode. Berechnet wurde jeweils die Wahrscheinlichkeit p für die Homogenität der verglichenen Werte ($p = > 0{,}05$: nicht signifikant; $p = 0{,}05$ bis 0,01*: schwachsignifikant; $p = 0{,}01$—0,001**: signifikant; $p = < 0{,}001$***: hochsignifikant).

Ergebnisse

1. Veränderungen des Lipidgehaltes der Leber

In den Tab. 1 u. 2 sind unsere Ergebnisse hinsichtlich der Leberlipide zusammengestellt. Für alle Fraktionen wurden jeweils der Absolutgehalt in Milligramm/Gramm Trockengewebe (A) und der relative Anteil der betreffenden Fraktion am Gesamtfettgehalt (B) angegeben, um Aussagen über die Mischungsrelation der Fraktionen zu ermöglichen.

Tabelle 1. *Das Verhalten der Gesamtlipide, der Phosphatide, der Neutralfette und der freien Fettsäuren der Leber bei langdauernder Cholesterinfütterung*
Angaben: A: mg/g Trockengewebe; B: %-Anteil am Gesamtlipidgehalt. Fütterzeit siehe Tab. 3

	Nr.	Gesamtlipide	Phosphatide		Neutralfett		Freie Fettsäuren	
		A	A	B	A	B	A	B
Kontrollen	N	127,4	85,8	67,3	4,4	3,45	7,0	6,20
	N 1	173,0	81,5	47,1	10,9	6,30	50,5	29,20
	N 2	148,5	96,0	64,6	11,4	7,68	—	—
	N 3	154,9	71,0	45,9	7,6	4,92	31,1	20,02
	N 5	122,0	59,5	48,8	4,9	4,02	23,5	19,27
	N 6	123,7	70,6	57,1	4,3	3,48	6,1	4,93
	N 7	178,0	95,0	53,5	7,1	3,99	46,3	26,00
Gefütterte Tiere	V	137,5	59,8	42,5	4,0	2,91	16,6	12,10
	V 1	149,3	52,0	34,8	17,2	11,50	33,4	22,40
	V 2	149,7	71,5	47,7	26,6	17,80	15,2	10,15
	V 3	152,0	88,6	58,3	14,9	9,80	9,3	6,12
	V 4	208,0	110,5	53,1	31,4	15,10	18,4	8,84
	V 5	245,1	99,0	40,4	34,5	14,09	—	—
	V 6	208,5	95,5	46,9	24,2	11,60	2,1	1,02
	V 7	271,5	126,7	46,7	34,6	12,70	8,1	2,83
	V 8	198,0	87,9	44,4	24,9	12,59	5,6	2,82
	V 9	232,5	132,5	57,0	55,0	23,65	—	—
	V 10	280,2	155,1	55,3	41,8	14,85	—	—
	V 11	158,0	60,8	38,5	16,6	10,50	32,1	20,30
	V 12	186,0	71,0	38,2	9,8	5,27	51,6	27,80
	V 13	198,0	73,0	36,9	9,4	4,74	45,8	23,10
	M_N :	146,5	79,9	40,7	7,95	4,84	27,6	17,6
	σM_N:	8,82	4,62	—	1,17	0,605	—	—
	M_V :	196,2	91,7	46,5	25,35	11,94	22,6	12,5
	σM_V:	12,44	8,15	—	3,75	1,448	—	—
	p:	0,004**	0,25	—	< 0,001***	< 0,001***	—	—

Der *Gesamtfettgehalt* (Tab. 1) stieg im Laufe der Cholesterinfütterung um etwa 34% an. Diese Zunahme begann erst in der 7. Fütterungswoche deutlich zu werden, ohne dann bei weiterer Fütterungsdauer ein charakteristisches Verhalten im Sinne weiteren Anstiegs oder eines Rückganges zu zeigen.

An dieser Zunahme des Lipidgehaltes der Leber hatte den stärksten absoluten Anteil das Gesamt-*Cholesterin* (Tab. 2), das um etwa 115%

Tabelle 2. *Das Verhalten des Cholesteringehaltes der Leber bei langdauernder Cholesterinfütterung*

Angaben: A: mg/g Trockengewebe; B: %-Anteil am Gesamtlipidgehalt. Fütterzeit siehe Tab. 3

	Nr.	Gesamtcholesterin		Freies Cholest.		Cholesterinester		Quotient: Freies Cholest. / Estercholest.
		A	B	A	B	A	B	
Kontrollen	N	5,7	4,47	0,6	0,47	5,1	4,00	0,118
	N 1	15,7	9,08	6,1	3,53	9,6	5,55	0,635
	N 2	17,6	11,85	3,9	2,62	13,7	9,23	0,284
	N 3	31,2	20,08	20,8	13,45	10,4	6,73	2,040
	N 5	19,7	16,14	11,3	9,26	8,4	6,88	1,346
	N 6	25,7	20,80	14,8	11,95	10,9	8,85	1,356
	N 7	18,1	10,17	7,4	4,16	10,7	5,82	0,692
Gefütterte Tiere	V	5,1	3,71	0,6	0,43	4,5	3,28	0,133
	V 1	19,5	13,07	7,9	5,29	11,6	7,78	0,680
	V 2	11,3	7,56	3,2	2,14	8,1	5,42	0,396
	V 3	23,7	15,60	7,6	5,00	16,1	10,60	0,472
	V 4	21,7	10,43	7,6	3,65	14,1	6,78	0,539
	V 5	83,9	34,30	16,4	6,70	67,5	27,60	0,243
	V 6	51,9	24,83	8,7	4,17	43,2	20,66	0,201
	V 7	56,3	20,77	6,8	2,52	49,5	18,25	0,137
	V 8	39,8	20,06	12,2	6,16	27,6	13,90	0,442
	V 9	23,6	10,14	6,7	2,88	16,9	7,26	0,396
	V 10	58,5	20,14	7,7	2,74	48,8	17,40	0,158
	V 11	29,3	18,47	8,8	5,57	20,5	12,90	0,429
	V 12	40,4	21,70	12,0	6,45	28,4	15,75	0,423
	V 13	51,6	26,07	13,6	6,87	38,0	19,20	0,358
	M_N :	19,1	13,24	9,26	6,48	9,83	6,86	0,923
	σM_N:	0,956	2,22	—	—	1,135	0,702	0,259
	M_V :	40,55	17,64	8,55	4,33	28,20	13,32	0,358
	σM_V:	5,89	2,016	—	—	4,975	2,15	0,0455
	p:	0,002**	0,16	—	—	0,002**	0,01*	0,05*

(+ 21,45 mg/g Trockengewebe) anstieg. Auch hier trat die Zunahme erst nach 60 Fütterungstagen in Erscheinung und blieb dann etwa konstant. Der Mittelwert des relativen Cholesteringehaltes am Gesamtfett änderte sich nicht signifikant, er lag jedoch nach der 7. Woche durchweg über dem Normalwert. Der Anstieg des Gesamtcholesterins war ausschließlich auf eine Vermehrung der Cholesterinester zurückzuführen, während

das freie Cholesterin praktisch unbeeinflußt blieb und eher noch etwas absank. Diese Tatsache ist deutlich aus dem Verhalten des Quotienten Freies Cholesterin:Estercholesterin zu entnehmen, der von 0,923 auf 0,358 absank (vgl. Tab. 2).

Die *Phosphatide* (Tab. 1) zeigten kein gesichertes Abweichen von der Norm. Bei Betrachtung der Einzelwerte ergibt sich jedoch, daß auch hier wie beim Gesamtfett und Cholesterin nach etwa 50—60 Tagen eine deutliche Zunahme eintrat. Im Gegensatz zu den bisher besprochenen Fraktionen kam es am Ende der Fütterungsperiode zu einem Absinken der Phosphatidwerte auf zum Teil unternormale Werte. Der Phosphatid-Cholesterin-Quotient verminderte sich im Mittel von 4,17 auf 2,26 (absolut) bzw. von 3,26 auf 2,64 (relativ), d. h. die in einigen Fällen auftretende Phosphatidvermehrung war nicht in der Lage, die durch Cholesterinzunahme bedingte Verkleinerung des Quotienten zu kompensieren.

Neben dem Cholesterin war in zweiter Linie das *Neutralfett* für den Gesamtlipidanstieg verantwortlich (Tab. 1). Im Vergleich zum Cholesterin und zu den Phosphatiden setzte die Neutralfettsteigerung schon relativ früh ein (deutlich bereits nach 40 Fütterungstagen). Gegen Ende der Versuchszeit wurde ähnlich wie bei den Phosphatiden ein Absinken der Werte auf Normalhöhe beobachtet. Im Mittel erreichte der Neutralfettgehalt der Leber der gefütterten Tiere das 3,2fache (absolut) bzw. 2,5fache (relativ) des Normalwertes.

Der Gehalt der Leber an *freien Fettsäuren* blieb während der Versuchszeit unverändert.

2. Veränderungen der Leberatmung und der Aktivität von Leberfermenten

Die *Gewebsatmung* der Leber (Tab. 3) sank bei den gefütterten Tieren im Mittel um etwa 25% ab. Im Gegensatz zu den Veränderungen der Fettfraktionen trat diese Verminderung des Sauerstoffverbrauches schon sehr früh in Erscheinung und blieb während der gesamten Versuchszeit nachweisbar.

Von den untersuchten *Leberphosphatasen* (Tab. 3) zeigte die alkalische bei den gefütterten Tieren keine Abweichung gegenüber der Norm, während die Aktivität der sauren Phosphatase im Mittel um 47% anstieg, ohne ein deutliches zeitliches Maximum erkennen zu lassen. Die Aktivität der *Cholinesterase* (Tab. 3) blieb im Mittel durch die Cholesterinfütterung unbeeinflußt, wies aber bei den Tieren V_5—V_{11} (62. bis 82. Tag) gegenüber der Norm deutlich erhöhte Werte auf. Die *Tributyrinspaltung* verminderte sich bei den gefütterten Tieren um 40% gegenüber der Norm. Dieser Befund kam besonders deutlich bei den Tieren V_3—V_7 (51.—72. Tag) zum Ausdruck.

Tabelle 3. *Das Verhalten der Gewebsatmung der Leber und der Aktivität von Leberfermenten bei langdauernder Cholesterinfütterung*
Aktivitätsangaben siehe Methodik. M = Mittelwert

Nr.	Fütterzeit (in Tagen)	Gewebsatmung (Q_{O_2})	Phosphatasee (sauer)	Phosphatase (alkalisch)	Cholinesterase	Tributyrinspaltung
N	0	—	—	5,55	—	58,9
N 1	0	2,54	0,87	—	11,6	50,2
N 2	0	2,45	1,63	10,30	9,4	57,0
N 3	0	1,97	2,08	8,60	12,2	39,8
N 4	0	1,60	2,10	10,00	16,1	47,7
N 5	0	1,75	1,44	12,00	9,6	45,5
N 6	0	2,05	2,00	12,50	10,0	63,0
N 7	0	2,25	4,43	17,60	13,5	60,0
V 1	41	1,27	5,20	5,60	5,4	42,0
V 2	41	1,30	6,15	2,00	5,6	31,4
V 3	51	1,70	0,70	1,85	9,0	17,3
V 4	51	1,57	1,01	2,65	10,0	24,3
V 5	62	1,50	—	22,70	19,4	17,3
V 6	62	1,85	—	20,30	20,5	19,5
V 7	72	1,85	3,20	30,70	14,5	21,0
V 8	72	2,02	4,00	31,50	27,0	40,7
V 9	79	1,15	1,91	8,20	20,0	37,7
V 10	79	1,47	2,60	8,25	15,5	41,5
V 11	86	1,67	2,04	6,70	18,5	33,0
V 12	86	1,42	2,75	9,40	14,0	38,1
V 13	89	1,45	4,25	11,40	8,9	41,4
M_N		2,09	2,08	10,94	11,77	52,6
σM_N		0,135	0,134	1,41	0,92	2,90
M_V		1,56	3,07	12,40	14,48	31,2
σM_V		0,07	0,126	2,92	1,82	2,76
p		0,002**	$< 0{,}001$***	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$< 0{,}001$***

3. Histologische Befunde[1]

Die histologische Untersuchung der sudan- und hämatoxylin-eosingefärbten Leberschnitte ließ als charakteristischen Befund eine im wesentlichen zentrale Verfettung erkennen. In den meisten Fällen waren die feineren Fetttröpfchen deutlich perivasculär, die gröberen im Innern des Zelleibes angeordnet. In den verfetteten Partien waren die Capillaren mitunter erweitert und an einzelnen Stellen von der Wand abgelöst. Zelluntergänge konnten nicht mit Sicherheit ausgemacht werden; gelegentlich einzelne pyknotische Kerne. Im HE-Schnitt traten im Falle stärkerer Verfettung die Reticulumzellen auffallend hervor. In diesen Fällen zeigte sich auch, soweit zu beurteilen, eine Verminderung des Glykogengehaltes. Im ganzen gesehen waren die Veränderungen bei den Tieren V_5—V_8 am deutlichsten ausgeprägt.

[1] Für die histologische Auswertung der Leberveränderungen sagen wir Herrn Prof. Dr. W. Eger (Pathol. Institut der Univ. Göttingen) unseren herzlichen Dank.

Besprechung der Ergebnisse

Im Verlaufe langdauernder Cholesterinfütterung an Kaninchen kam es von der 7. Fütterungswoche an zur Ausbildung einer Fettleber, woran in erster Linie das Cholesterin beteiligt war; jedoch nicht, wie man erwarten sollte, in Form des freien Cholesterins, sondern ausschließlich als Estercholesterin. Dieser Befund ist nicht leicht zu erklären, beruht aber vielleicht auf einer Abnahme der endogenen Cholesterinsynthese wie sie von Byers u. Mitarb. beobachtet wurde.

Der starken Zunahme des Estercholesterins geht eine Zunahme des Neutralfettes in der Leber parallel. Wir möchten diese Neutralfettzunahme, die auch mikroskopisch deutlich nachweisbar war, auf eine gesteigerte Fettsäuresynthese aus Acetat, welches abgebautem Cholesterin entstammt, zurückführen.

Ob das Auftreten der Fettsäuren in Form des veresterten Cholesterins einer Transportform für Fettsäuren oder aber für Cholesterin entspricht oder schließlich mit den Erfordernissen zur gesteigerten Phosphatidsynthese im Zusammenhang steht, ist noch nicht zu entscheiden. Wir möchten annehmen, daß diese Fettsäurezunahme zur Aufrechterhaltung des Gefüges Phospholipoid-Neutralfett-Estercholesterin eine wichtige Rolle spielt, deren Bedeutung jedoch noch weitgehend unbekannt ist (vgl. Schulze).

Auffallend sind die Relationen von Leber- und Serum-Fetten. Während sich Gesamtfett, Estercholesterin und Neutralfett in Leber und Serum gleichsinnig verhalten, d. h. mit zunehmender Fütterungsdauer ansteigen, tritt beim freien Cholesterin nur im Serum eine erhebliche Vermehrung ein, während seine Menge in der Leber nicht zunimmt. Wir nehmen an, daß diese Vermehrung des freien Cholesterins im Serum durch Resorption des verfütterten Cholesterins erklärt werden kann und somit eher alimentär als durch gesteigerte Synthese (Gold u. Mitarb.) bedingt ist.

Ebenso auffallend ist das Verhalten der Phosphatide in der Leber, die praktisch gegenüber den Kontrollen unverändert sind. Bei dem hohen Neutralfettangebot in der Leber sollte man einen hohen Phosphatidgehalt erwarten. Wenn man ihn nicht findet, muß man, bei Berücksichtigung des gleichzeitig bestehenden hohen Blutphosphatid-Spiegels annehmen, daß die Phosphatide die Leber rasch verlassen. Da praktisch alles Blutphosphatid der Leber entstammt (Fischler u. Mitarb., Goldman u. Mitarb.), kann daher auf eine gesteigerte Phosphatidsynthese in der Leber geschlossen werden. Ähnliche Befunde wurden von Zilversmit u. Mitarb. bei experimenteller Atherosklerose erhoben. Wenn man in Rechnung stellt, daß die Einstellung des Gleichgewichtes zwischen Blut- und Leber-Phosphatid normalerweise nur wenige Stunden dauert, muß man aus unseren Ergebnissen schließen, daß die Fähigkeit, dieses Gleichgewicht aufrechtzuerhalten bei unseren Versuchstieren weitgehend verlorengegangen ist. Eine andere Möglichkeit, den relativ niedrigen Leber-

phosphatidspiegel zu erklären, wäre ein erhöhter Phosphatidabbau in der Leber. Diese Annahme ist jedoch an Hand unserer Befunde nicht zu prüfen.

Überblickt man die Gesamtheit der hier geschilderten Veränderungen der Lipidfraktionen der Leber, so kommt man zu dem Schluß, daß durch die Cholesterinfütterung tiefgreifende Alterationen des Lipidstoffwechsels verursacht werden; daß also der Organismus nicht etwa nur einer passiven Cholesterinüberschwemmung unterworfen und damit zur Ablagerung von Cholesterin in verschiedenen Geweben gezwungen wird. Das Wesen dieser Störung im Fettstoffwechsel ist in einer Verschiebung des Stoffwechselgleichgewichts zugunsten einer stark gesteigerten Fettsäuresynthese zu sehen.

Die Herabsetzung der Gewebsatmung der Leber kann auf zwei Faktoren zurückgeführt werden: 1. wird durch die deutlich nachweisbare Verfettung der Leberzellen wahrscheinlich eine Störung im Ablauf der strukturgebundenen biologischen Endoxydation hervorgerufen und 2. ist auf Grund der Veränderungen im Fettstoffwechsel damit zu rechnen, daß ein großer Teil der anfallenden C_2-Fragmente nicht verbrannt, sondern zur Synthese, besonders von Phosphatiden und von Fettsäuren Verwendung findet.

Die Veränderungen der Aktivität der sauren Phosphatase finden ihre Erklärung, wenn man sie gleichzeitig mit den Abweichungen im Lipidstoffwechsel betrachtet. Die von uns beobachtete Zunahme der Phosphatide setzt ein erhöhtes Angebot an Phosphat voraus. Mit dieser, zur Phosphatidsynthese notwendigen Phosphatmobilisierung bringen wir die Aktivitätsänderungen der sauren Phosphatase in Zusammenhang. Die Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase ist somit in gewisser Weise als Anpassungserscheinung anzusprechen.

Die Lipaseaktivität verhält sich ähnlich wie die Phosphatide, d. h. während im Serum eine erhebliche Steigerung der Aktivität auftrat (Krüskemper u. Schulze), fehlte dieser Aktivitätsanstieg in der Leber. Da die Lipase, wie auch die anderen hier untersuchten Fermente vorwiegend in der Leber gebildet werden, möchten wir annehmen, daß die Lipase ebenso wie die Phosphatide die Leber rasch verläßt und so zu einer Aktivitätserhöhung im Serum Anlaß gibt.

Aus dem fehlenden Aktivitätsverlust der Cholinesterase und der alkalischen Phosphatase ist schließlich zu folgern, daß durch die Cholesterinfütterung keine *schweren* Störungen der Leberfunktion, besonders bezüglich ihrer Fähigkeit zur Synthese spezifischer Eiweißkörper, bewirkt werden.

Zusammenfassung

Bei langdauernder Cholesterinfütterung am Kaninchen kommt es zu folgenden Veränderungen in der Leber:

das freie Cholesterin praktisch unbeeinflußt blieb und eher noch etwas absank. Diese Tatsache ist deutlich aus dem Verhalten des Quotienten Freies Cholesterin:Estercholesterin zu entnehmen, der von 0,923 auf 0,358 absank (vgl. Tab. 2).

Die *Phosphatide* (Tab. 1) zeigten kein gesichertes Abweichen von der Norm. Bei Betrachtung der Einzelwerte ergibt sich jedoch, daß auch hier wie beim Gesamtfett und Cholesterin nach etwa 50—60 Tagen eine deutliche Zunahme eintrat. Im Gegensatz zu den bisher besprochenen Fraktionen kam es am Ende der Fütterungsperiode zu einem Absinken der Phosphatidwerte auf zum Teil unternormale Werte. Der Phosphatid-Cholesterin-Quotient verminderte sich im Mittel von 4,17 auf 2,26 (absolut) bzw. von 3,26 auf 2,64 (relativ), d. h. die in einigen Fällen auftretende Phosphatidvermehrung war nicht in der Lage, die durch Cholesterinzunahme bedingte Verkleinerung des Quotienten zu kompensieren.

Neben dem Cholesterin war in zweiter Linie das *Neutralfett* für den Gesamtlipidanstieg verantwortlich (Tab. 1). Im Vergleich zum Cholesterin und zu den Phosphatiden setzte die Neutralfettsteigerung schon relativ früh ein (deutlich bereits nach 40 Fütterungstagen). Gegen Ende der Versuchszeit wurde ähnlich wie bei den Phosphatiden ein Absinken der Werte auf Normalhöhe beobachtet. Im Mittel erreichte der Neutralfettgehalt der Leber der gefütterten Tiere das 3,2fache (absolut) bzw. 2,5fache (relativ) des Normalwertes.

Der Gehalt der Leber an *freien Fettsäuren* blieb während der Versuchszeit unverändert.

2. Veränderungen der Leberatmung und der Aktivität von Leberfermenten

Die *Gewebsatmung* der Leber (Tab. 3) sank bei den gefütterten Tieren im Mittel um etwa 25% ab. Im Gegensatz zu den Veränderungen der Fettfraktionen trat diese Verminderung des Sauerstoffverbrauches schon sehr früh in Erscheinung und blieb während der gesamten Versuchszeit nachweisbar.

Von den untersuchten *Leberphosphatasen* (Tab. 3) zeigte die alkalische bei den gefütterten Tieren keine Abweichung gegenüber der Norm, während die Aktivität der sauren Phosphatase im Mittel um 47% anstieg, ohne ein deutliches zeitliches Maximum erkennen zu lassen. Die Aktivität der *Cholinesterase* (Tab. 3) blieb im Mittel durch die Cholesterinfütterung unbeeinflußt, wies aber bei den Tieren V_5—V_{11} (62. bis 82. Tag) gegenüber der Norm deutlich erhöhte Werte auf. Die *Tributyrinspaltung* verminderte sich bei den gefütterten Tieren um 40% gegenüber der Norm. Dieser Befund kam besonders deutlich bei den Tieren V_3—V_7 (51.—72. Tag) zum Ausdruck.

Tabelle 3. *Das Verhalten der Gewebsatmung der Leber und der Aktivität von Leberfermenten bei langdauernder Cholesterinfütterung*
Aktivitätsangaben siehe Methodik. M = Mittelwert

Nr.	Fütterzeit (in Tagen)	Gewebsatmung (Q_{O_2})	Phosphatasee (sauer)	Phosphatase (alkalisch)	Cholinesterase	Tributyrinspaltung
N	0	—	—	5,55	—	58,9
N 1	0	2,54	0,87	—	11,6	50,2
N 2	0	2,45	1,63	10,30	9,4	57,0
N 3	0	1,97	2,08	8,60	12,2	39,8
N 4	0	1,60	2,10	10,00	16,1	47,7
N 5	0	1,75	1,44	12,00	9,6	45,5
N 6	0	2,05	2,00	12,50	10,0	63,0
N 7	0	2,25	4,43	17,60	13,5	60,0
V 1	41	1,27	5,20	5,60	5,4	42,0
V 2	41	1,30	6,15	2,00	5,6	31,4
V 3	51	1,70	0,70	1,85	9,0	17,3
V 4	51	1,57	1,01	2,65	10,0	24,3
V 5	62	1,50	—	22,70	19,4	17,3
V 6	62	1,85	—	20,30	20,5	19,5
V 7	72	1,85	3,20	30,70	14,5	21,0
V 8	72	2,02	4,00	31,50	27,0	40,7
V 9	79	1,15	1,91	8,20	20,0	37,7
V 10	79	1,47	2,60	8,25	15,5	41,5
V 11	86	1,67	2,04	6,70	18,5	33,0
V 12	86	1,42	2,75	9,40	14,0	38,1
V 13	89	1,45	4,25	11,40	8,9	41,4
M_N		2,09	2,08	10,94	11,77	52,6
σM_N		0,135	0,134	1,41	0,92	2,90
M_V		1,56	3,07	12,40	14,48	31,2
σM_V		0,07	0,126	2,92	1,82	2,76
p		0,002**	$< 0{,}001$***	$> 0{,}1$	$> 0{,}1$	$< 0{,}001$***

3. Histologische Befunde[1]

Die histologische Untersuchung der sudan- und hämatoxylin-eosingefärbten Leberschnitte ließ als charakteristischen Befund eine im wesentlichen zentrale Verfettung erkennen. In den meisten Fällen waren die feineren Fetttröpfchen deutlich perivasculär, die gröberen im Innern des Zelleibes angeordnet. In den verfetteten Partien waren die Capillaren mitunter erweitert und an einzelnen Stellen von der Wand abgelöst. Zelluntergänge konnten nicht mit Sicherheit ausgemacht werden; gelegentlich einzelne pyknotische Kerne. Im HE-Schnitt traten im Falle stärkerer Verfettung die Reticulumzellen auffallend hervor. In diesen Fällen zeigte sich auch, soweit zu beurteilen, eine Verminderung des Glykogengehaltes. Im ganzen gesehen waren die Veränderungen bei den Tieren V_5—V_8 am deutlichsten ausgeprägt.

[1] Für die histologische Auswertung der Leberveränderungen sagen wir Herrn Prof. Dr. W. Eger (Pathol. Institut der Univ. Göttingen) unseren herzlichen Dank.

Methodik

90 Ratten des Glaxostammes im Gewicht zwischen 190 und 250 g wurden 14 Tage vor Versuchsbeginn auf eine Standardkost gesetzt und unter gleichen Umweltsbedingungen gehalten. 35 Tiere dienten als Gallespender. Von diesen erhielten 25 (je 5 männliche, weibliche, frühgravide und kastrierte Tiere beiderlei Geschlechts) zu Beginn der Gallegewinnung Testosteronphosphat* in wäßriger Lösung in die

Tabelle 1

Gallespender mit intralienaler Testosteronphosphatapplikation				*Galleempfänger*				
Tiergewicht	Test. Ph. in mg intral.	Galle in ml	Überlebenszeit in Stunden	Tiergewicht	Zahl d. Inj. in 24stündg. Intervallen	Dosis/Inj.	Bl.-Dr. $^1/_n$ mg	Prost. in mg
I männl.								
250	10	1,8	10	190	2	0,9	18	19
240	10	4,2	16	220	2	2,1	22	20
200	20	2,0	25	200	2	1,0	14	12
220	20	5,0	26	200	5	1,0	42	38
210	20	0,8	11	190	3	0,25	15	18
II weibl.								
250	10	2,0	9	220	2	1,0	9	13
200	10	2,5	18	230	2	1,25	16	18
240	20	3,6	24	220	2	1,8	19	20
240	20	4,5	31	240	3	1,5	28	22
200	20	4,2	25	210	3	1,4	18	16
III frühgr.								
200	10	0,8	7	220	2	0,4	14	15
240	10	1,7	10	210	2	0,8	17	14
180	20	2,2	9	190	2	1,1	15	18
200	20	0,9	6	190	3	0,30	19	14
200	20	1,5	5	200	3	0,5	16	12
IV kastr. männl.								
210	10	0,9	7	200	2	0,45	12	14
210	10	2,2	12	190	2	1,1	14	13
220	20	1,9	22	210	2	0,95	13	16
210	20	3,0	20	190	3	1,0	18	19
200	20	5,5	18	220	3	1,8	22	21
V kastr. weibl.								
260	10	0,8	7	200	2	0,4	14	15
210	10	0,7	7	210	2	0,35	15	16
250	20	0,9	10	200	2	0,45	12	11
220	20	0,6	10	190	3	0,2	15	18
200	20	1,2	10	190	3	0,4	15	14

* Für die Überlassung der benötigten Versuchsmengen an Telipex aquosum (Testosteronphosphat) danken wir dem wissenschaftlichen Leiter des chemischen Laboratoriums der Sanabo, Wien, Herrn Dr. Kerschbaum.

Milz injiziert. Die restlichen 10 (5 männliche und 5 weibliche) waren zur Gewinnung von Normalgalle bestimmt und blieben somit *ohne* Testosteronapplikation.

Nach Einbindung einer Kanüle in den Ductus choledochus wurde die abfließende Galle mittels eines gebogenen Glasröhrchens aus dem Abdomen herausgeleitet, in sterilen Glasampullen aufgefangen und bis zum Tode des Versuchstieres gesammelt.

Bei den für die Testosteronapplikation vorgesehenen Tieren wurde die Injektion in folgender Weise durchgeführt: Die Milz wurde von der Laparotomiewunde aus ein Stück vorgezogen und um ihren medialen Pol eine stärkere Ligatur vorgelegt. In den aus dieser Ligaturschlinge vorragenden Milzpol wurde eine dünne Injektionsnadel eingestochen und vorsichtig bis in die Gegend des gegenüberliegenden Milzpols vorgeschoben. Nach erfolgter Applikation einer 10 bzw. 20 mg

Tabelle 2

Gallespender ohne Testosteronphosphatapplikation			*Galleempfänger*				
Tiergewicht	Galle in ml	Überlebenszeit in Stunden	Tiergewicht	Galleinj. in 24stündg. Intervallen	Dosis/Inj.	Bl.-Dr. in mg	Prost. in mg
VI männl.							
240	2,5	24	230	2	1,25	9	11
220	2,2	16	210	2	1,1	8	7
190	3,6	17	190	3	1,2	9	8
210	3,2	16	210	4	0,8	7	7
220	4,0	18	250	8	0,5	10	9
VII weibl.							
230	2,2	13	210	2	1,1	8	7
210	4,5	26	190	2	2,25	9	8
190	3,4	19	200	3	1,1	6	6
250	5,2	34	190	4	1,3	7	6
200	4,3	17	200	8	0,5	8	7

Testosteronphosphat enthaltenden wäßrigen Lösung wurde während des Rückziehens der Nadel die vorgelegte Ligatur zugezogen und somit der Einstichkanal komprimiert. Dadurch wurde ein Rückfließen der applizierten Lösung verhindert.

Die von den Spendertieren gewonnene Galle wurde kastrierten männlichen Ratten subcutan verabfolgt. Diese waren im Alter von 28 Tagen bei einem Gewicht von höchstens 35 g kastriert worden. Vier Monate nach der Kastration wurden sie für die Versuche als Galleempfänger herangezogen und in 7 Gruppen zu je 5 Tieren eingeteilt.

Gruppe I erhielt die Galle der männlichen, Gruppe II der weiblichen, Gruppe III der frühgraviden, Gruppe IV von kastrierten männlichen und Gruppe V von kastrierten weiblichen Spendern. Alle diese Gallespender hatten intralienal Testosteronphosphat erhalten. Gruppe VI erhielt die Galle von den männlichen und Gruppe VII die von den weiblichen Normaltieren. Jedes Empfängertier erhielt die gesammelte Galle eines Spenders. Die Verabreichung der Galle in den vorgenannten 7 Gruppen erfolgte in 24stündigen Intervallen. Die Art der Dosierung und die Anzahl der verabreichten Injektionen gehen aus Tab. 1 und 2 hervor.

Um ein zusätzliches Bild über die Wirksamkeit des verwendeten Testosteronpräparates zu erhalten, haben wir 5 weiteren kastrierten männlichen Ratten (Gruppe VIII) subcutan je 2 Injektionen zu 1 mg der verwendeten Testosteronphosphatlösung in 24stündigen Intervallen und einer gleich großen Gruppe (IX) je

2 mg pro Injektion verabreicht. Eine Gruppe von 10 männlichen kastrierten Tieren blieb als Kontrollgruppe unbehandelt.

Die Tötung der Tiere sämtlicher Versuchsgruppen erfolgte 24 Std nach der letzten Injektion durch Äther. Bläschendrüsen und Prostata wurden sorgfältig freipräpariert, in frischem Zustand auf einer Torsionswaage gewogen und anschließend in Formalin fixiert. Nach entsprechender Verarbeitung wurden die Anhangsdrüsen jedes Tieres histologisch untersucht, wobei zusätzlich die Organe eines Tieres aus jeder Gruppe in Serien geschnitten wurden. Die histologische Beurteilung erfolgte bei jenen Tieren, die insgesamt nur 2 Injektionen erhalten hatten und 48 Std nach Beginn der Applikation getötet worden waren, an Hand des Mitogenesetestes von Voss u. Loewe. In den Fällen, bei denen die Verabreichung länger durchgeführt worden war (s. Tabelle), wurden zur Beurteilung des Effektes die sonst üblichen Kriterien herangezogen[11].

Ergebnisse

Bei den Empfängertieren der Gruppen I—V (Galle von Spendern nach intralienaler Testosteronphosphatapplikation) waren bei jenen Tieren, die 48 Std nach der ersten Galleinjektion getötet worden waren, schon makroskopisch Effekte an Bläschendrüsen und Prostata festzustellen. Die Bläschendrüsen schienen ödematös, wirkten dadurch leicht vergrößert und wiesen eine reichlichere Gefäßversorgung auf. Auch die Prostata schien im Gegensatz zu jener der Vollkastraten reichlicher durchblutet zu sein. Wesentlich deutlicher war dieser makroskopische Effekt bei den Tieren, die 3 oder mehr Galleinjektionen in 24stündigen Intervallen erhalten hatten. Gewichtsmäßig ergab sich in allen 5 Gruppen eine Erhöhung der Gewichte der akzessorischen Geschlechtsdrüsen gegenüber denen der Kastraten (Tab. 1 u. 3).

Tabelle 3. *Kastrierte Kontrollgruppe*

Tiergewicht	Bl.-Dr.	Prostata
230	8	8
190	7	6
210	8	6
190	6	7
200	10	7
230	7	8
250	7	7
200	9	6
250	10	10
210	9	8

Die histologische Untersuchung der Bläschendrüsen ergab das Vorhandensein von Mitosen im Ausmaß zwischen 2 und 6%. Die Epithelzellen wiesen bläschenförmige helle Kerne mit deutlich sichtbaren Nucleoli auf. Zum Teil waren sie hochprismatisch mit wabiger Plasmastruktur. Die Prostata schien besser angesprochen zu haben. Die Mitosen waren zahlreicher, die Zellen fast durchwegs hochprismatisch.

In den Fällen, bei denen die Galle bis zu 5 Tagen verabreicht worden war, waren zwar weniger Mitosen in Bläschendrüsen und Prostata zu finden, jedoch war das Epithel als vollaktiv zu bezeichnen. Im Lumen der Drüsen war stellenweise Sekret zu finden. Abb. 1 und 2 zeigen Prostata und Bläschendrüsen der betreffenden Tiere.

Die Empfängertiere der Gruppen VI und VII, die Galle von männlichen und weiblichen Normaltieren erhalten hatten, zeigten weder ge-

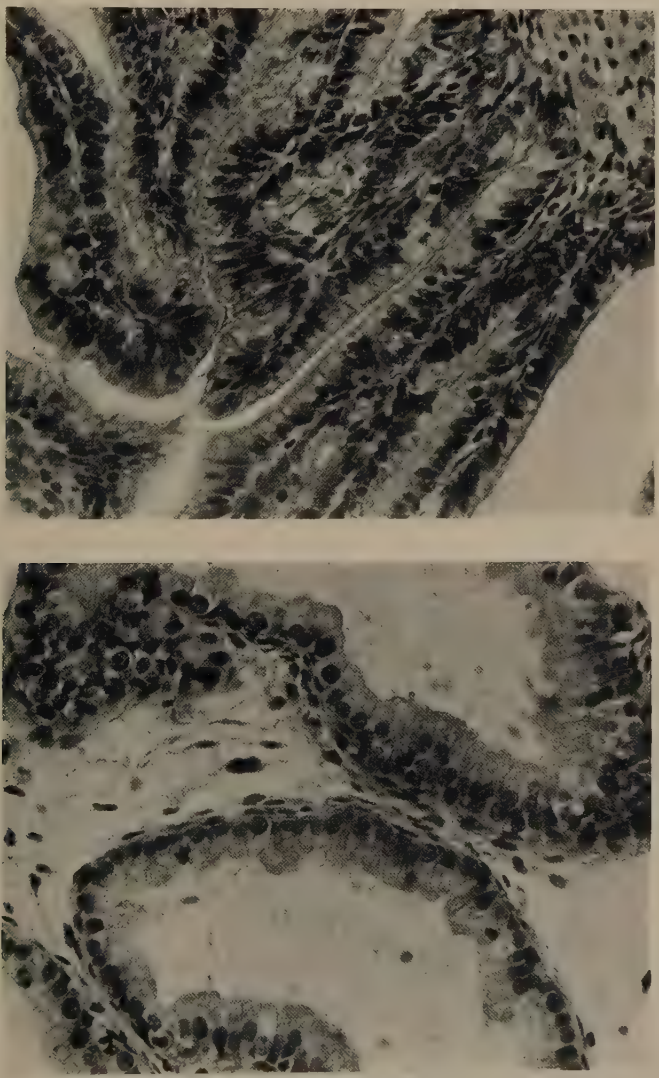


Abb. 1 und 2. Bläschendrüse und Prostata eines Empfängertieres aus Gruppe I nach 5 Galleinjektionen in 24stündigen Intervallen

wichtsmäßig noch histologisch einen Unterschied gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe. Auch nach Durchmusterung zahlreicher Serienschnitte konnten wir keine Mitosen feststellen. Auch Sekret war nicht nachweisbar (Tab. 2 u. 3).

Die Tiere der Gruppen VIII und IX, die in zwei gleichen Dosen in 24stündigen Intervallen insgesamt 2 bzw. 4 mg Testosteronphosphat erhalten hatten, zeigten bei der höheren Dosierung eine annähernd gleiche Stimulation an Bläschendrüsen und Prostata, wie die der Gruppen I—V; die Gewichte der akzessorischen Geschlechtsdrüsen lagen in der gleichen Größenordnung. Nach Verabreichung von 2 mg zeigten die Tiere sowohl gewichtsmäßig wie histologisch einen schwächeren Effekt. Mitosen waren seltener zu finden, die Gewichte lagen nur wenig über jenen der kastrierten Kontrollgruppe.

Tabelle 4

	Tiergewicht	2mal in 24stündigen Intervallen Testost. Ph. in mg subc.	Bl.-Dr. in mg	Prostata in mg
VIII	210	1	10	8
	250	1	12	11
	250	1	10	11
	200	1	13	9
	115	1	14	13
IX	255	2	14	12
	190	2	17	18
	200	2	15	14
	220	2	17	15
	235	2	18	16

Diskussion

Die Menge der von den Gallespendern gewonnenen Galle schwankte naturgemäß innerhalb weiter Grenzen, wobei zumeist eine gewisse Abhängigkeit von der Dauer der Überlebenszeit zu bestehen schien. Die Wirkung der applizierten Galle auf Bläschendrüsen und Prostata ließ in den Gruppen I—V weder gewichtsmäßig noch histologisch faßbare Unterschiede erkennen. Das ist besonders deshalb bemerkenswert, weil laut Tab. 1 die Überlebenszeit in den Gruppen III und V nur maximal 10 Std betrug, bei Gruppe I, II und IV jedoch im Durchschnitt weitaus länger dauerte. Bei Gruppe III und V war die Menge der gewonnenen Galle entsprechend gering. Sie reichte aber trotzdem aus, um annähernd die gleichen androgenen Effekte an den Anhangsorganen der Empfängertiere hervorzurufen, wie sie bei den Empfängertieren der anderen Gruppen beobachtet wurden. Dieses Verhalten scheint nur zwei Erklärungen zuzulassen. Entweder es ist anzunehmen, daß bei der obigen Versuchsanordnung die Ausscheidungsspitze der androgen wirksamen Stoffe in der Galle innerhalb der 10 Stunden-Grenze zu suchen ist, oder es handelt sich um einen innerhalb der Versuchszeit von 48 Std an Bläschendrüsen und Prostata maximal erreichbaren Effekt. Es ist zwar wahrscheinlich, daß das intralienal injizierte wäßrige Testosteronphosphat die Leber ge-

wissermaßen stoßartig überschwemmt; in Vorversuchen konnte nämlich festgestellt werden, daß nach intralienaler Injektion öliger Lösungen die Leber binnen kurzem zahlreiche Fettembolien aufwies. Wenn man aber in Rechnung stellt, daß zur Ausbildung histologisch nachweisbarer Wachstumsvorgänge ein gewisser Zeitraum verstreichen muß, so scheint uns die zweite Erklärungsmöglichkeit eher plausibel. Für sie würde auch sprechen, daß nach der hohen Dosis von 4 mg Testosteronphosphat (Gruppe VIII) kein stärkerer Effekt festzustellen war als nach Verabreichung der in 10 Std gesammelten Galle.

Barry u. Mitarb. und etwas später Ashmore hatten bei Versuchen mit radioaktiv markiertem 4 C^{14}-Testosteron festgestellt, daß ein Großteil der Radioaktivität in Galle und Faeces wieder aufgefunden werden kann. Genauere Angaben über die Natur der in Galle und Faeces erscheinenden Metaboliten wurden jedoch nicht gemacht. Ashmore schließt auf Grund der Löslichkeit der rückgewonnenen Radioaktivität sogar auf Metaboliten *ohne* Steroidstruktur.

Unsere Versuche haben gezeigt, daß die nach intralienalen Injektionen von 10 bzw. 20 mg Testosteronphosphat aufgefangene Galle Stoffe enthalten muß, die androgene Effekte an den akzessorischen Geschlechtsdrüsen kastrierter männlicher Ratten hervorrufen. Es handelt sich dabei um den Nachweis eines *biologischen* Effektes.

Nach der Verabreichung von Galle unbehandelter geschlechtsreifer Ratten war an den akzessorischen Organen weder gewichtsmäßig noch histologisch ein androgener Effekt zu erkennen. Dabei wurden zum Teil bedeutende Mengen von Galle appliziert und auch bis zu einem Zeitraum von 8 Tagen gegeben. Ob dieses Ergebnis zu der Annahme berechtigt, daß körpereigene Androgene physiologischerweise nicht in Form aktiver Metaboliten in der Galle erscheinen, bleibe dahingestellt. Möglicherweise handelt es sich dabei um die Frage der Empfindlichkeit der Nachweismethoden.

Zusammenfassung

Die nach intralienalen Injektionen von Testosteronphosphat gesammelte Galle, kastrierten männlichen Tieren verabreicht, ruft deutliche Gewichtserhöhungen an Bläschendrüsen und Prostata hervor und führt zum Auftreten reichlicher Mitosen. In der Galle der nichtlebergeschädigten Ratte können also biologisch aktive Androgene erscheinen.

Literatur

[1] Ashmore, J., W. H. Elliot and E. A. Doisy: J. of Biol. Chem. **200**, 661 (1953). — [2] Barry, M. C., M. L. Eidinoff, K. Dobriner and T. F. Gallagher:

Endocrinology **50**, 587 (1952). — [3] Biskind, G. R.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **43**, 259 (1940). — [4] Biskind, G. R., and J. Mark: Bull. Johns Hopkins Hosp. **65**, 212 (1939). — [5] Biskind, M. S., and G. R. Biskind: Endocrinology **32**, 97 (1943). — [6] Bryson, M. J.: Samuels L. T. and H. C. Golthorpe: Endocrinology **47**, 89 (1950). — [7] Burill, M. M., and R. R. Green: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **44**, 273 (1940). — [8] Burill, M. M., and R. R. Green: Endocrinology **31**, 73 (1942). — [9] Grayhack. T. T., and M. W. Scott: Endocrinology **48**, 453 (1951). — [10] Levedahl, B. H., and L. T. Samuels: J. of Biol. Chem. **186**, 857 (1950). — [11] Moore, C. R., W. Hughes and F. Gallagher: Amer. J. Anat. **45**, 109 (1930). — [12] Pfeiffer, C. A.: Amer. J. Anat. **58**, 195 (1936). — [13] Samuels, L. T.: Recent. Progr. in Hormone Res. **4**, 65 (1949). — [14] Samuels, L. T., C. Mc Caulay and D. M. Seller: J. of Biol. Chem. **168**, 477 (1947). — [15] Schneider, W., u. H. Rauscher: Arch. exper. Path. und Pharmakol. **224**, 137 (1955). — [16] Voss H. E., u. S. Loewe: Dtsch. med. Mschr. **1930**, 1.

Dr. W. Schneider, I. Universitäts-Frauenklinik, Wien IX, Spitalgasse 23 (Österreich)

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 177—182 (1955)

Aus der Frauenklinik (Direktor: Prof. Dr. H. Roemer) der Medizinischen Akademie der Justus-Liebig-Hochschule Gießen

Über die leistungssteigernde Wirkung des embryonalen Herzextraktes (Corhormon) bei Reisebrieftauben

Von

W. Höreth

(Eingegangen am 12. August 1955)

Corhormon — so nannten Mikó u. Törö den vor 19 Jahren von ihnen aus embryonalen Herzen isolierten Stoff — hat nichts Gemeinsames mit den sogenannten Herzhormonen (Sinushormon oder Haberlandtscher Stoff). Nach der von Lettré durchgeführten Analyse ist anzunehmen, daß der wirksame Faktor des Corhormon eine Komplexverbindung von Magnesium mit einer Polycarbonsäure ist. Adrenalin, Acetylcholin, Histamin, Nucleotide und Nucleoside sind nicht im Corhormon enthalten.

Lettré konnte die von Törö angegebene wachstumsfördernde und mitoseanregende Wirkung des Corhormon auf Herzfibroblasten in der Gewebekultur und den Antagonismus des Corhormon gegenüber dem Colchicin, also die Aufhebung der mitosehemmenden Wirkung des Colchicin durch Corhormon bestätigen.

Korenyi u. Hajdu haben 1943 gezeigt, daß mit Corhormon behandelte Ratten die erschöpfende Arbeit in der Lauftrommel viel besser vertragen als unbehandelte Kontrolltiere, und daß bei ihnen keine Herzhypertrophie und nur eine geringe Nebennierenhypertrophie auftritt. Kuschinsky u. Possel haben die Corhormonwirkung im Schwimmversuch mit Ratten kontrolliert. Sie haben dabei weder eine Herz- und Nebennierenhypertrophie noch eine Gewichtsabnahme der Corhormontiere feststellen können. Daraus schlossen sie, daß Corhormon die Leistung des Herzens so verbessert, daß einer Erschöpfung, d. h. einer relativen Insuffizienz vorgebeugt wird.

Von Varga ist der Auffassung, daß es sich beim Corhormon um eine dem Nebennierenrindenhormon ähnliche Wirkung handelt.

Helmreich bzw. Mohr u. Helmreich konnten tierexperimentell eine herzspezifische, enorme Steigerung des oxydativen Stoffwechsels durch Corhormon sowie eine ausgeprägte Glykogenmobilisation aus der Leber und dem Herzmuskel konstatieren.

Die idealen Bedingungen für die Prüfung des embryonalen Herzextraktes Corhormon auf eine Leistungssteigerung schienen uns im *Reisebrieftaubensport* gegeben, denn Sonntag für Sonntag wird den Tieren das Letzte an körperlicher Leistung abverlangt.

Zur Durchführung dieser Versuche war es nötig, Versuchspaare zu haben, die gleichen Geschlechts, gleicher Abstammung und gleichen

Alters waren. Im ersten Jahr unserer Versuche wurden nur gleichaltrige Brüderpaare zusammengestellt, die dann die sonntäglichen Flüge ab Kitzingen (142 km), Ansbach (200 km), Regensburg (302 km), Straubing (345 km) und Passau (415 km) nach Gießen machen mußten. Um eindeutige und nicht anzuzweifelnde Resultate zu erzielen, wurde jedesmal das nach sportlich-fachlichem Ermessen bessere Reisetier als Kontrolltier benutzt, während der weniger gute Bruder mit Corhormon behandelt wurde.

Die Dosis Corhormon wurde langsam gesteigert, so daß in der Woche vor dem Flug ab Regensburg und Straubing jedesmal 0,5 cm^3 subcutan unter die lockere Haut in der Hüftgelenksgegend (um die Flugfähigkeit nicht zu beeinflussen) gegeben wurden, am Verschickungstag dann je 0,7 cm^3, weil die Tauben noch zwei Tage mit der Bahn zum Auflaßort unterwegs sein mußten. Vor dem Flug ab Passau (415 km) wurde dann jedesmal 1,0 cm^3 Corhormon injiziert. Soweit die Tiere nicht unterwegs waren, wurden sie täglich mit Corhormon behandelt. Bis zu dem ersten ausgewerteten Flug von 142 km hatte jedes Tier 3 Corhormoninjektionen (insgesamt 1,0 cm^3) bekommen, bis zu dem Flug von 415 km 20 Injektionen (Gesamt-Dosis 11,4 cm^3).

Begonnen wurden die Flüge im ersten Jahr unserer Versuche mit 5 Versuchspaaren, am Ende der Flüge waren noch zwei Versuchspaare vollzählig. Ausgefallen sind 3 Versuchspaare, und zwar zwei, weil das wohl bessere, aber nicht mit Corhormon behandelte Tier nicht zurückkehrte, während ein Versuchspaar infolge Ausbleibens der mit Corhormon behandelten, aber an sich weniger guten Reisetaube ausfiel. Zu bemerken ist hier, daß dieses Tier erst 3 Injektionen Corhormon bekommen hatte, die Behandlungszeit also sehr kurz war.

Maßgebend für die Auswertung der Versuche war die *Reihenfolge der Ankunft der Tauben am Flugtag*. Die Versuche führten im ersten Versuchsjahr zu folgenden Ergebnissen:

19mal war das Corhormontier schneller als das nichtbehandelte Kontrolltier,

3mal war das nichtbehandelte Kontrolltier schneller als die Corhormontaube.

Das sind also bezüglich der erwarteten Corhormonwirkung:

84,21% positive Ergebnisse,

15,79% negative Ergebnisse.

Bei den drei negativen Ergebnissen ist zu bemerken, daß in einem Falle die nichtbehandelte Taube, die vor dem mit Corhormon behandelten Bruder zurückgekehrt war, auf die Reise geschickt worden war, als ihre Brut kurz vor dem Ausschlüpfen stand. Das aber ist ein anerkannter großer Vorteil, da die Taube zu diesem Zeitpunkt in einer guten Verfassung und der Heimkehrwille besonders stark ist.

Bewertet wurde außerdem noch die *körperliche Verfassung bei der Rückkehr* der Brieftauben. Dabei wurde festgestellt, daß die Corhormontiere durchweg frischer ankamen als die unbehandelten Kontrolltiere, die bei den größeren Entfernungen und besonders bei Gegenwind sehr

ermattet waren und kraftlos und schlapp auf ihren Plätzen saßen, von denen sie sogar von Jungtieren vertrieben wurden.

Die Ergebnisse sprechen deutlich für eine Leistungssteigerung durch Corhormon, die auch in einer *besseren Durchschnittsgeschwindigkeit der Corhormontiere* von etwa 1143 m/min gegenüber 952 m/min zum Ausdruck kommt. Setzt man die Reisegeschwindigkeit der unbehandelten und an sich besseren Reisetauben mit 100% an, so flogen die *Corhormontiere um 20,1% schneller* als die unbehandelten Kontrolltiere.

Um die positiven Ergebnisse zu sichern, wurden die Versuche in derselben Anordnung im folgenden Jahr mit einer größeren Anzahl von Versuchspaaren wiederholt. Diesmal wurden auch Weibchen eingesetzt. Die Reisezeit wurde mit 22 gleichgeschlechtlichen, gleichaltrigen Geschwisterpaaren begonnen. Bis zu dem ersten ausgewerteten Flug hatte diesmal jedes Tier fünf Injektionen (insgesamt 2,5 cm³ Corhormon) bekommen, bis zu dem Flug von 415 km 20 Injektionen (Gesamt-Dosis 11,5 cm³ Corhormon). Die Schlechtwetterlage in diesem Jahr brachte es mit sich, daß im gesamten westeuropäischen Raume bei allen Preisflügen Tausende von Reisetauben verlorengingen. Einzelne Flüge wurden zu direkten Katastrophenflügen. Infolge der ungünstigen „meteorologischen Umwelt" (Seilkopf) ist es nicht verwunderlich, daß von 22 Geschwisterpaaren der Versuchsreihe am Ende der Flüge nur noch 4 Versuchspaare vollzählig waren.

Bei 10 von 22 Versuchspaaren war zuerst das nicht mit Corhormon behandelte Tier ausgefallen, bei drei Paaren gingen Corhormon- und Kontrolltier zur gleichen Zeit verloren und bei fünf Versuchspaaren blieb zuerst das Corhormontier aus.

Von 78 Einsätzen von Versuchspaaren war 44 mal das Corhormontier schneller als das Kontrolltier, 34 mal das nichtbehandelte Kontrolltier schneller als die Corhormontaube.

Das sind also: 56,41% Erfolge, 43,59% negative Ergebnisse.

Auf den ersten Blick sehen die Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe keineswegs so eindeutig aus wie die der ersten. Hier sind aber die ungünstigen meteorologischen Umstände mit schlechtem Flugwetter auf großen Teilen der Flugstrecken und andere atmosphärische Störungen zu berücksichtigen.

So ist es möglich, daß gerade die schnellsten Tiere in eine Schlechtwetterfront hineingeflogen sind, während die Tiere mit mittlerer Fluggeschwindigkeit dann bessere Wetterverhältnisse vorgefunden haben und dementsprechend noch früher in der Heimat angekommen sind[1]. Außerdem darf nicht vergessen werden, daß auch bei dieser Serie ja die weniger guten Reisetauben als Corhormontiere flogen, während die guten, aber nicht mit Corhormon behandelten Kontrolltiere waren.

[1] Seilkopf, Meteorologisches Amt für Nordwestdeutschland, Hamburg.

Trotz der Katastrophenflüge des zweiten Versuchsjahres ist das positive Ergebnis der Corhormonversuche mit 56,41% noch eindeutig genug. Auch hier fiel wieder die *gute körperliche Verfassung der Corhormontiere* auf, die Frische gegenüber den nichtbehandelten Kontrollen. Wenn man überhaupt von einer Ermüdung der Corhormontauben sprechen konnte, so war diese im Gegensatz zu den unbehandelten Kontrollen in auffallend kurzer Zeit überwunden. Der Organismus war also durch die Corhormonbehandlung den Anforderungen der Flüge mit ihren enormen körperlichen Belastungen besser gewachsen.

Die *Durchschnittsgeschwindigkeiten* waren in diesem Versuchsjahr deutlich geringer: Corhormontiere etwa 911 m/min, Kontrollen 817 m/min. Demnach war die Durchschnittsgeschwindigkeit der Corhormontiere hier um 11,6% größer als die der unbehandelten Kontrolltiere.

Während in den beiden ersten Versuchsserien die vom Reisetaubenfachmann als bessere Reisetauben angesehenen Tiere als Kontrollen flogen, und die weniger guten Geschwister mit Corhormon behandelt wurden, flogen in einer dritten Versuchsserie die vom sportlich-fachlichen Standpunkt besseren Reisetauben als Corhormontiere und die weniger guten Geschwister als Kontrollen. Die Auswahl wurde diesmal deshalb so getroffen, um dem Einwand begegnen zu können, daß in den beiden ersten Versuchsserien die Auswahl der Corhormontiere eventuell nach Gewicht und Größe erfolgt sei, also die schwächeren Tiere, die aber gut die leistungsfähigsten sein könnten, als Corhormontiere ausgewählt worden seien. Im übrigen beurteilt der Reisetaubenkenner die Leistungsfähigkeit der Brieftauben nicht nach Größe und Gewicht, sondern auf Grund seiner Erfahrung in der Hauptsache nach dem Temperament, der Intelligenz und dem Gefieder.

Die Vorbehandlung dieser Serie wurde in derselben Weise durchgeführt wie bei der zweiten Serie. Dieses dritte Versuchsjahr wurde mit 13 gleichgeschlechtlichen, gleichaltrigen Geschwisterpaaren begonnen. Am Ende der Flüge waren noch 4 Versuchspaare vollzählig. Insgesamt fielen 9 Tiere aus, d. h. sie kehrten nicht in ihren Heimatschlag zurück. und zwar waren es nur unbehandelte Kontrolltiere.

Von 46 Einsätzen von Versuchspaaren war 46mal das Corhormontier schneller als das Kontrolltier. Das sind also: 100% Erfolge.

Noch auffallender als bei den beiden ersten Versuchsserien war die weit bessere körperliche Verfassung, die Frische der Corhormontiere bei der Rückkehr vom Fluge. Im starken Gegensatz dazu standen die völlig ermatteten, apathischen unbehandelten Kontrolltiere. Wenn auch bei den letzten und weitesten Flügen einige Corhormontiere nach der Rückkehr einen ermüdeten Eindruck machten, so hatten sie sich innerhalb von 1—2 Std erholt und waren dann wieder völlig frisch, so daß ihnen die

körperliche Beanspruchung nicht mehr anzusehen war. Im Gegensatz zu der Rauflust der Corhormontiere saßen die unbehandelten Kontrollen tagelang temperamentlos und müde im Schlage.

Die *durchschnittliche Reisegeschwindigkeit* betrug bei den Corhormontauben 969 m/min, bei den Kontrolltieren 416 m/min. Setzt man wieder die Fluggeschwindigkeit der Kontrollen mit 100% an, so flogen die *Corhormontiere um 133% schneller* als die Kontrollen. Die Corhormontauben benötigten also noch nicht einmal die Hälfte der Flugzeit der zurückgekehrten Kontrolltiere.

Insgesamt war also bei 40 Versuchspaaren mit 146 Einsätzen 109mal das Corhormontier schneller als die Kontrolle, 37mal das unbehandelte Tier schneller als das mit Corhormon behandelte.

74,66% Corhormon-Erfolgen stehen also 25,34% negative Ergebnisse gegenüber.

Die durchschnittliche Fluggeschwindigkeit der Corhormontauben betrug 1008 m/min. die der unbehandelten Kontrolltiere nur 728 m/min. Demnach flogen die *mit Corhormon behandelten Tauben um 38,5% schneller als die nicht vorbehandelten.*

Dieses Ergebnis an Reisebrieftauben spricht also deutlich für eine Leistungssteigerung durch Corhormon.

Bei diesem schon eindeutigen Ergebnis muß noch beachtet werden, daß bei 100 von 146 Einsätzen jedesmal das nach Erfahrung der Reisetaubenzüchter qualitativ schlechtere Tier als Corhormontier benutzt wurde. Wäre die Auswahl gerecht gewesen, d. h. wäre bei der Hälfte der Versuchspaare das bessere und bei der anderen Hälfte der Versuchspaare das schlechtere Tier als Corhormontaube benutzt worden, dann wäre das Ergebnis sicher noch eindeutiger ausgefallen.

In einer weiteren Versuchsreihe kontrollierten wir den von Törö und später von Lettré geschilderten anatomischen Befund am Herzmuskel des Versuchstieres nach Corhormonbehandlung. Aus Rentabilitätsgründen verwandten wir hierzu keine Brieftauben, sondern 10 ingezüchtete, männliche Rattenpaare von gleichem Alter und gleichem Gewicht. 10 Tiere bekamen täglich 1,0 cm^3 Corhormon subcutan injiziert und wurden ebenso wie 10 unbehandelte Kontrolltiere täglich 2 Std in der Lauftrommel strapaziert. Vier weitere Tiere waren unbehandelte und unbelastete Kontrollen. Nach 15 Tagen wurden die Tiere getötet und die Herzschnitte mikroskopisch untersucht. Wir fanden, wie Lettré, einen vermehrten Kernbestand des Myokards mit Kernteilungen, aber auch viele elastische Fasern. Die Kernvermehrung möchten wir auf eine „Aktivierung des differenzierungsfähigen, interstitiellen Mesenchyms" (Mohr) beziehen, in der wir nach unseren histologischen Befunden das anatomische Substrat der Corhormonwirkung sehen.

Die Leistungssteigerung durch Corhormon dürfte einerseits auf eine funktionell bessere Reparation geschädigter Herzmuskelpartien mit Bildung von elastischen Fasern zurückzuführen sein, andererseits auf

eine herzspezifische Steigerung des oxydativen Stoffwechsels (Helmreich), drittens auf Anregung der Glykolyse (Mohr u. Helmreich).

Dem Chemiewerk Homburg, Frankfurt/Main, sind wir für die Unterstützung bei den Versuchen sehr zu Dank verpflichtet.

Literatur

Helmreich, E.: Diskussionsbeitrag Therapiewoche Karlsruhe 1950. — Korenyi, Z., u. I. Hajdu: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **200**, 641 (1943). — Kuschinsky, G., u. H. Possel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 424 (1948). — Kuschinsky, G.: Klin. Wschr. **1947**, 468. — Lettré, H.: Vortrag Sept. 1949, Chemiker-Tagung München. — Mikö, I., u. I. Törö: Gyogyaszat Nr. 37, 1935. — Mohr, HJ., u. E. Helmreich: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 327 (1952). — Mohr, HJ.: Dtsch. med. Wschr. **1952**, 1287. — Diskussionsbeitrag Therapiewoche Karlsruhe 1950. — Nieth, H.: Beitr. path. Anat. **110**, 618 (1949). — Seilkopf, H.: Reisetaube **15**, 234 (1951). — Strauss, LH.: Dtsch. med. Wschr. **1952**, 1284. — Törö, I.: Z. mikrosk.-anat. Forsch. **41**, 1 (1937). — Von Varga, L.: Med. Klin. **1950**, 274.

Dr. W. Höreth, Frauenklinik d. Med. Akademie d. Justus-Liebig-Hochschule Gießen

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 183—195 (1955)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Schulemann)

Experimentelle Untersuchungen über die Toxikologie insecticider chlorierter Kohlenwasserstoffe

I. Mitteilung

Von

O. R. Klimmer

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. Juli 1955)

Die Entwicklung neuer Kontaktinsecticide aus der Gruppe der chlorierten Kohlenwasserstoffe, die mit den Stoffen *DDT* und *Hexachlorcyclohexan* (*HCH*) so erfolgreich begann, ist in den letzten Jahren weiter fortgeschritten. Es ist eine ganze Reihe neuer Halogenkohlenwasserstoffe mit ausgezeichneter insecticider Wirkung bekannt geworden, die wir unter dem Namen Diën- und Terpenstoffe zusammenfassen können.

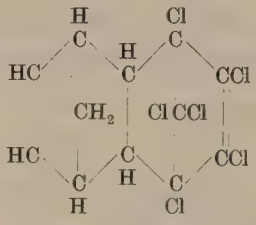
Die wichtigsten zur Gruppe der Diën-Stoffe gehörenden Insecticide sind *Aldrin*, *Chlordan*, *Dieldrin* und *Heptachlor*. Zur Terpengruppe gehört u. a. das *Toxaphen*. Ihre chemische Struktur geht, soweit bekannt, aus der folgenden Übersicht hervor:

Die Literatur über die Chemie und Toxikologie des *DDT* und *HCH* ist fast unübersehbar geworden. Die bisher beste Zusammenstellung stammt von Riemschneider. Aber auch über die Insecticide aus der Diën- und Terpengruppe sind in den letzten Jahren zahlreiche Arbeiten, vor allem von amerikanischen Autoren, veröffentlicht worden, die sich mit der Chemie und dem Nachweis dieser Stoffe beschäftigen[1, 6, 9, 16, 19, 20, 23, 27, 28, 34, 35, 45, 49, 54, 60–65, 66], andere, die über tierexperimentelle Untersuchungen berichten[4, 5, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 21b, 31–33, 36, 38–40, 43, 44, 47, 51, 52, 67, 69, 73], schließlich Mitteilungen, die diese Stoffgruppen von der gewerbetoxikologischen Seite beleuchten und Vergiftungsfälle am Menschen auswerten[2, 18, 30, 41, 42, 48, 55, 56, 57, 68, 72]. Wegen der bei Herstellung, Lagerung und Anwendung dieser Stoffe möglichen Gefahren für den Menschen (Industriearbeiter, Anwender, Konsument behandelter Nahrungsmittel) sind diese Insecticide in vielen Ländern Verordnungen und Gesetzen unterstellt worden, die, wie die neueste Fassung in den USA, zum Teil auch „Toleranzwerte in und auf Pflanzenprodukten" festlegen[74].

Trotz der Verschiedenheit der chemischen Konstitution besitzen die Insecticide *Aldrin*, *Chlordan*, *DDT*, *Dieldrin*, *HCH*, *Heptachlor* und *Toxaphen* eine ganze Reihe ähnlicher physikalisch — chemischer und biologischer Eigenschaften, die eine gemeinsame Betrachtung dieser Stoffe ermöglichen.

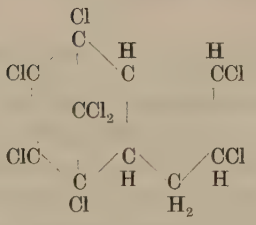
Bei den Diën- und Terpenstoffen handelt es sich zumeist nicht um reine, genau definierte Produkte, sondern um Gemische aus dem Wirkstoff und mehr oder minder hohen Anteilen an höher oder niedriger chlorierten Nebenprodukten. Daraus erklärt sich die Verschiedenheit der Literaturangaben über Aussehen, Geruch, physikalisch-chemisches Verhalten und pharmakologische Wirksamkeit gegenüber Insekt und Warmblüter, die eine Beurteilung erschweren.

1. *Aldrin*:



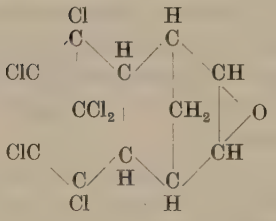
1, 2, 3, 4, 10, 10-Hexachlor-1, 4, 4a, 5, 8, 8a-hexahydro-1, 4, 5, 8,-dimethanonaphthalin (US-Formulierung).

2. *Chlordan*:



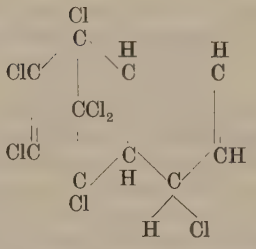
1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 8-Oktachlor- 2, 3, 3a, 4, 7, 7a-hexahydro-4, 7,-methanoindan (US-Formulierung).

3. *Dieldrin*:



1, 2, 3, 4, 10, 10-Hexachlor-6, 7,-epoxy- 1, 4, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-oktahydro-1, 4, 5, 8,-dimethanonaphthalin (US-Formulierung).

4. *Heptachlor*:



1, 4, 5, 6, 7, 8, 8-Heptachlor-3a, 4, 7, 7a-tetrahydro-4, 7-endomethanoindan (US-Formulierung).

5. *Toxaphen*: „Chloriertes Camphen" unbekannter Struktur (C_{10} H_{10} Cl_5?).

Außer der insecticiden Wirksamkeit ist diesen Stoffen gemeinsam, daß sie wie *DDT* und *HCH* praktisch nicht wasserlöslich, dafür aber sehr gut fett- und lipoidlöslich sind. Die leichte Aufnahme durch die Haut (*Aldrin*, *Chlordan*, *Toxaphen*, *Dieldrin*), die hohe Affinität zum Körperfett und den lipoidreichen Organen (ZNS), die meist erhebliche Speicherbarkeit im Körper (*Chlordan*, *DDT*) und die Gefahr

einer kumulativen Giftwirkung einerseits, die im allgemeinen hohe Rückstandsfestigkeit auf der Pflanzenoberfläche bei einigen Stoffen andererseits finden so ihre Erklärung. Hinsichtlich ihrer Flüchtigkeit verhalten sich diese Stoffe ganz verschieden. Manche besitzen eine relativ hohe Flüchtigkeit und eine hohe Toxicität bei Einatmung am Warmblüter, wie *Chlordan*, *Dieldrin*, *Toxaphen*. Wie die Chlorkohlenwasserstoffe der aliphatischen Reihe sind alle diese Stoffe einschließlich des *DDT* und *HCH* Parenchymgifte, die ihre Wirkung vor allem in den Zellen des ZNS und der Leber und Niere, aber auch am Herzmuskel, an der Darmschleimhaut und den innersekretorischen Organen entfalten: Fettige Degeneration, Nekrosen, Capillarschäden. Ihre Resorption durch den Magendarmkanal, die Haut und die Atemwege hängt nicht nur von der Konstitution, sondern vor allem von der Anwendungsform ab. Gefährlich sind vor allem Zubereitungen in organischen Lösungsmitteln und Suspensionen mit oberflächenaktiven Stoffzusätzen sowie feinste Stäube. Einige Stoffe beeinflussen den Sauerstoffbedarf der Zellen (Lord), Wachstum und die Cholinesteraseaktivität (Steigerung) sowie den Oestrus (Verminderung) beim Warmblüter (Crevier-Ball-Kay) durch Einwirkung auf die Schilddrüse und das innersekretorische System. Die Stoffgruppe greift am ZNS und Rückenmark an, wir konnten in eigenen Untersuchungen an der dekapitierten Katze die Befunde von Gowdey-Graham-Sequin-Stavraky bestätigen. Ob auch periphere Angriffspunkte bestehen, ist noch nicht genügend geklärt. Je nach Dosis, Anwendungsform, Resorptionsgeschwindigkeit und Abbau tritt das akute Vergiftungsbild beim Warmblüter mehr oder weniger rasch ein, das sich in Freßunlust, Unruhe, Tremor, Erregungszuständen, Bissigkeit, Koordinationsstörungen, tonisch-klonischen Krämpfen epileptiformer Art, Atemstillstand und Tod äußern kann. Entgiftung über Paarung an Glucuronsäure und Schwefelsäure und Acetylierung sind festgestellt, beim Abbau können, wie z. B. beim *Chlordan* und *Heptachlor*, Produkte auftreten, die noch giftiger als der eigentliche Stoff sind (Radomski-Davidow).

Die Toxicität der einzelnen Stoffe für den Warmblüter schwankt, wie sich z. B. aus den Zahlen für die akute orale LD 50 ergibt, je nach Reinheitsgrad, Zubereitungs- und Anwendungsform und Tierart in weiten Grenzen. Eine Umrechnung der an der Ratte gewonnenen oralen akuten Toxicitätszahlen (LD 50) auf den Menschen ist auch bei diesen Stoffen ebenso unmöglich wie die Beurteilung ihrer Gefährlichkeit allein an Hand dieser Werte. Eine vergleichende Bewertung der Giftigkeit ist selbstverständlich nur möglich, wenn auch die Haut- und Inhalationsgiftigkeit, Speicherbarkeit und Kumulationsgefahr und latente histologische Schädigungen berücksichtigt werden. Die im folgenden angegebenen mittleren akuten oralen Tödlichkeitswerte an der Ratte geben daher nur ein einseitiges Bild von der Wirkung dieser Stoffe:

Akute orale LD 50 an der weißen Ratte in mg/kg Tier

Stoff	Nach A. J. Lehman: (Öllösung)	andere Autoren: (Öl u. Suspensionen)
Aldrin	67	25— 60
Chlordan (techn.)	457	250—750
Dieldrin	87	50—100
DDT	250	115—500
Heptachlor	90	90—125
Lindan	125	125—225
Toxaphen	69	40—120

Auch bei chronischer Verfütterung verhalten sich die einzelnen Stoffe ganz verschieden.

Allgemeinsymptome und Organschädigungen sind beobachtet worden bei chronischer Verfütterung von mg Wirkstoff pro kg Futter (ppm):

Aldrin	10—20 ppm	Heptachlor	5 ppm
Chlordan ab	2,5 ppm	Lindan	100 ppm
DDT	5 ppm	Toxaphen	100 ppm
Dieldrin	25 ppm		

Um uns ein eigenes Urteil über die Giftigkeit und Gefährlichkeit dieser auch in Deutschland hergestellten und verwendeten Stoffe zu bilden, haben wir im Rahmen von Toxicitätsprüfungen neuerer Kontaktinsecticide, die wir seit einiger Zeit im Auftrage des Bundesernährungsministeriums und in enger Zusammenarbeit mit der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Braunschweig am Pharmakologischen Institut der Universität Bonn durchführen, die oben genannten Stoffe im Vergleich mit *DDT* und *Lindan* (*γ-HCH*) in akuten und chronischen Versuchen untersucht. Nur *Aldrin*, *Dieldrin*, *DDT* und *Lindan* konnten in reiner Form geprüft werden. Ferner benutzten wir ein weitgehend gereinigtes *Chlordan*, ein technisches *Heptachlor*, das zu 72% aus reiner Substanz und zu 28% aus verwandten Substanzen bestand (*Velsicol 1068*) und ein technisches *Toxaphen*, bei dem genaue Angaben über den Reinheitsgrad nicht zu erhalten waren.

Die Präparate wurden uns zum Teil von der Firma Deutsche Shell A.G., zum Teil von der Firma Velsicol Corporation, Chicago 11 (Ill.), denen wir hier nochmals danken möchten, zur Verfügung gestellt. Die Stoffe kamen entweder in Ol. Arachidis gelöst, oder mit dem Emulgator W 233, einem biologisch indifferenten polyoxaethylierten Phenol, emulgiert oder, bei den Fliegenversuchen, in Acetonlösung zur Anwendung.

I. Biologische Testung der Stoffe an Musca domestica

Zur Charakterisierung der Stoffe schien uns eine vergleichende Testung an biologischem Material notwendig. Um an einem völlig gleichen Insektenmaterial arbeiten zu können, benutzten wir selbstgezüchtete, nicht resistente, vier Tage alte Stubenfliegen (Musca domestica). Acetonlösungen mit je 10 mg Wirkstoff wurden in gleichgroße, etwa 40 cm^2 große Petri-Schalendeckel gegeben, das Aceton vorsichtig abgedampft und die Schalen mit dem Wirkstoffbelag bei Zimmertemperatur (20° C) unter gleichgroße Fliegenschalen geschoben. Pro Stoff wurden fünf Schalen mit je 20 Fliegen verwendet. Zur Auswertung zählten wir über 8—9 Std halbstündlich die Anzahl der in irreversibler Rückenlage befindlichen Fliegen. Um die reine Dampfwirkung der Stoffe von ihrer Gesamtwirkung (Kontakt, Fraß, Inhalation) trennen zu können, wurden in einer zweiten Versuchsreihe die ebenso beschickten Petri-Schalendeckel mit einer Gaze überzogen und so jede Berührung der Fliegen mit den Stoffen unmöglich gemacht. In jedem Versuch dienten 100 unbehandelte Fliegen der gleichen Zucht als Kontrolltiere (fünf Schalen). Das Ergebnis dieser beiden Versuchsreihen ist auf den Abb. 1. und 2 graphisch dargestellt.

Bei der ersten Versuchsreihe (Gesamtwirkung) zeigen die einzelnen Insecticide gewisse Unterschiede hinsichtlich des Eintritts und der Stärke ihrer Wirkung: Die Reihenfolge lautet *Lindan* (*γ-HCH*); *DDT*,

Chlordan, Heptachlor; *Aldrin, Dieldrin*; *Toxaphen*. Das Erscheinungsbild war bei allen Stoffen gleich: Anfänglich Unruhe mit starkem Putzen, zunehmendem Bewegungsdrang, Coordinationsstörungen mit Taumeln, Kreiselbewegungen beim Laufen und Fliegen, Seiten- und Rückenlage

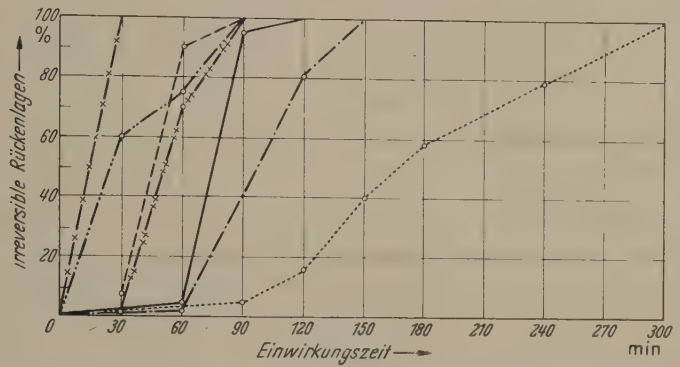


Abb. 1. *Gesamtwirkung* bei 20° C an je 100 gezüchteten Stubenfliegen von je 10 mg Aldrin —; Chlordan — — —; Dieldrin — · —; DDT — · — · —; γ-HCH — × —; Heptachlor — × × —; Toxaphen --------

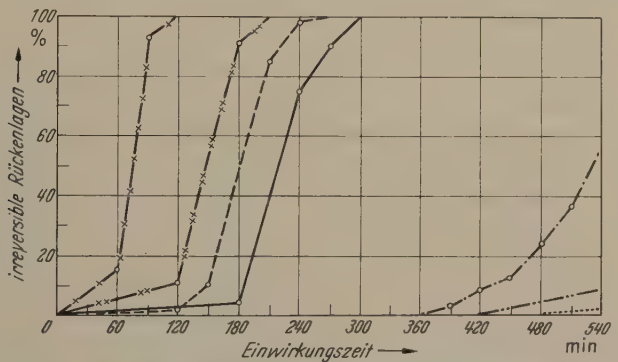


Abb. 2. *Reine Inhalationswirkung* bei 20° C an je 100 gezüchteten Stubenfliegen von je 10 mg Adrin —; Chlordan — — —; Dieldrin — · —; DDT — · — · —; γ-HCH — × —; Heptachlor — × × —; Toxaphen ---

mit starken Extremitäten- und Flügelbewegungen, Kreiseln auf dem Rücken, irreversible Rückenlage, Apathie, Lähmung, Tod.

Bei den Stoffen *Heptachlor* und *Toxaphen* ist zu berücksichtigen, daß hier keine reinen, sondern technische Produkte untersucht wurden, so daß diese beiden Insecticide in unseren Versuchen nur bedingt mit den übrigen reinen Stoffen verglichen werden können.

Prüft man aber diese Insecticide auf reine Inhalationswirkung, dann bieten sie auf Grund ihrer ganz verschiedenen Flüchtigkeit ein anderes Bild (Abb. 2): Zwar ist auch hier *Lindan* am wirksamsten, es benötigt jedoch die vierfache Zeit wie in Versuchsreihe I zur irreversiblen Rücken-

lage aller Tiere. In der Gruppe der nächstwirksamsten Stoffe tritt an die Stelle des *DDT* das *Heptachlor*; das *Aldrin* erweist sich hier wirksamer als bei der Testung der Gesamtwirkung. *Chlordan* und *Aldrin* benötigen zur gleichen Endwirkung etwa die zweieinhalbfache Zeit als das *Lindan*. Mit weitem Abstand folgen *Dieldrin*, *DDT* und *Toxaphen*, von denen selbst nach 9 Std Einwirkung keines die 100%ige irreversible Rückenlage der Fliegen bewirkt: *Dieldrin* 56%, *DDT* 8% und *Toxaphen* nur 2%.

Die 200 Kontrollfliegen zeigten in beiden Versuchsreihen keinerlei auffällige Erscheinungen.

II. Vergleichende Untersuchungen über die akute orale Toxicität an der weißen Ratte

Die genannten sieben Stoffe wurden an männliche, seit 12 Std nüchterne Ratten von 160—200 g Gewicht in öliger Lösung (Ol. Arachidis) und in jedesmal frisch bereiteten wäßrigen Emulsionen (Emulgator W 233) mit der Schlundsonde verfüttert, die Tiere 8—10 Tage nachbeobachtet.

Die mittleren Tödlichkeitswerte (LD 50) stellen sich bei den einzelnen Stoffen wie folgt dar:

Anzahl der Ratten: 420.

Stoff	LD 50 in mg/kg Ratte	
	ölige Lösung	wäßrige Emulsion
Aldrin	45	50
Chlordan	150	180
DDT	250	360
Dieldrin	65	65
Heptachlor	100	130
Lindan	130	250
Toxaphen	90	125

Das Vergiftungsbild glich bei allen Stoffen dem bei *DDT* und *Lindan* beschriebenen: Schreckhaftigkeit, Unruhe, Berührungsempfindlichkeit, Bissigkeit, Tremor, tonisch-klonische Krämpfe, Tod durch Atemstillstand in atonischem Zustand. Nur der zeitliche Ablauf der Erscheinungen war bei den einzelnen Insecticiden verschieden: Die Symptome traten bei *Aldrin*, *Chlordan* und *Heptachlor* sehr langsam ein und führten oft erst nach 2—3 Tagen zu Krämpfen und nach 2—6 Tagen zum Tode der Tiere. Bei *DDT*, *Lindan* und *Toxaphen* kam es meist schon nach 1—2 Std zu den oben beschriebenen Erscheinungen und meist innerhalb der ersten 12 Std zum Tode. Bei *Dieldrin* setzten die Symptome nach 2—5 Std ein, der Tod trat aber oft erst nach 2—3 Tagen ein. Die Organe der Tiere zeigten außer starker Durchblutung, vor allem der Lunge, keinen auffälligen makroskopischen und mikroskopischen Befund.

III. Versuche über die chronische orale Toxicität an der Ratte

Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt:

1. Tägliche Verfütterung von 32 mg *DDT* und *Lindan* in öliger Lösung und Emulsion pro kg Ratte = 6—10 mg Wirkstoff pro Tier, mit der Schlundsonde über 6 Monate. Das entspricht bei einem Rattengewicht von durchschnittlich 250 g und einer täglichen Nahrungsaufnahme von 20 g einem Gehalt von 400 ppm *DDT* bzw. *Lindan* im Futter (1 ppm = 1 mg Wirkstoff/kg Futter). Anzahl der Tiere pro Stoff: 48 weiße zur Hälfte männliche und weibliche Ratten und 24 Kontrolltiere, die nur Ol. Arachidis bzw. Emulsion ohne Wirkstoff erhielten.

Ergebnis

Ergebnis. a) Erscheinungsbild. Bei beiden Stoffen kam es in der ersten Woche zu einer gesteigerten nervösen Erregbarkeit, Bissigkeit, im letzten Viertel der Versuchszeit zu Tremor und vereinzelten Kloni. Sämtliche Tiere waren gegen Versuchsende auffallend bösartig und zeigten ein struppiges Fell. Alle Tiere nahmen an Gewicht stark zu. Wir hatten den Eindruck, daß die mit *Lindan* gefütterten Ratten und bei beiden Stoffen die weiblichen Tiere die angegebenen Erscheinungen ausgeprägter zeigten als die männlichen.

b) Hungerungsversuch. Nach 26 Wochen wurde die Verfütterung der Stoffe beendet und die Tiere auf ein Viertel der bisherigen täglichen Futtermenge gesetzt. Die Tiere nahmen rasch an Gewicht ab. Bei beiden Stoffen, bei *DDT* stärker als bei *Lindan*, trat sehr bald eine gesteigerte nervöse Erregbarkeit und Neigung zu Krämpfen auf. Wir führen dies auf die Mobilisierung der im abgebauten Fett gespeicherten Insecticide zurück, wie dies auch von Fitzhugh u. Nelson beschrieben worden ist. Nach Rückkehr zur normalen Futtermenge verschwanden diese Symptome wieder.

c) Fertilität. Die Paarungsversuche mit behandelten männlichen und weiblichen Ratten deuten bei beiden Stoffen darauf hin, daß die Fortpflanzungsfähigkeit eingeschränkt war und die lebenden Jungtiere nur in wenigen Exemplaren überlebten. Eine statistische Auswertung ist wegen der zu geringen Anzahl der Paare unmöglich.

d) Letalität. Bis Versuchsende (26 Wochen) waren in den einzelnen Gruppen folgende Tiere spontan gestorben: *Lindan-Öl* 83%, *Lindan-Emulsion* 46%, *DDT-Öl* 21,5%, *DDT-Emulsion* 17%.

e) Sektionsbefunde. Die Organe der spontan gestorbenen und bei Versuchsende getöteten Tiere zeigten bei beiden Stoffen vermehrte Durchblutung, die Leber war meist deutlich vergrößert unter vermehrter Läppchenzeichnung. Histologisch fand sich eine mittel- bis großtropfige diffuse Verfettung der Acini an der Peripherie der Leberläppchen. Die Epithelien der Tubuli contorti I. Ordnung wiesen vereinzelt feintropfige Verfettung und deutliche Plasmaveränderungen auf, die aber nicht sicher beurteilt werden können, da sie, zumindest zum Teil postmortale Verände-

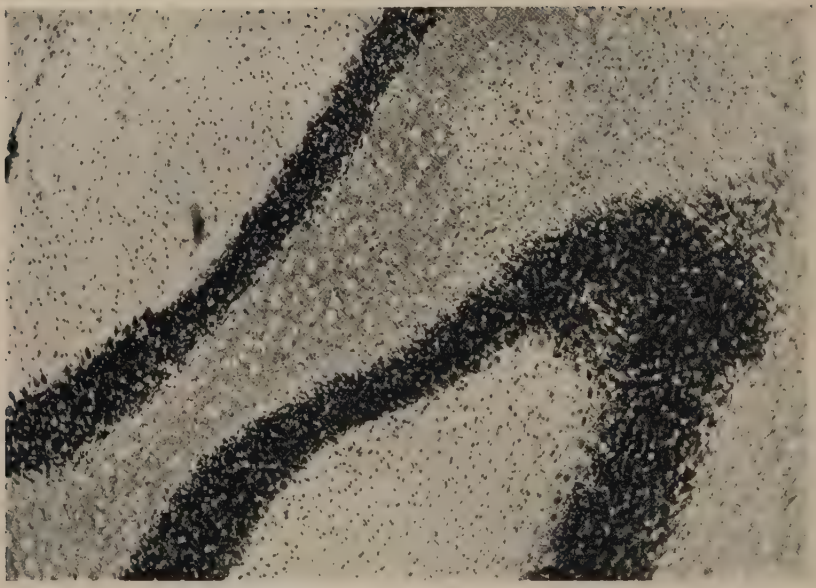


Abb. 3. *Kleinhirn Ratte* nach chron. DDT-Fütterung (32 mg/kg) H.-E.-Färbung. Übersicht, 99× vergrößert: Deutliche Vacuolisierung

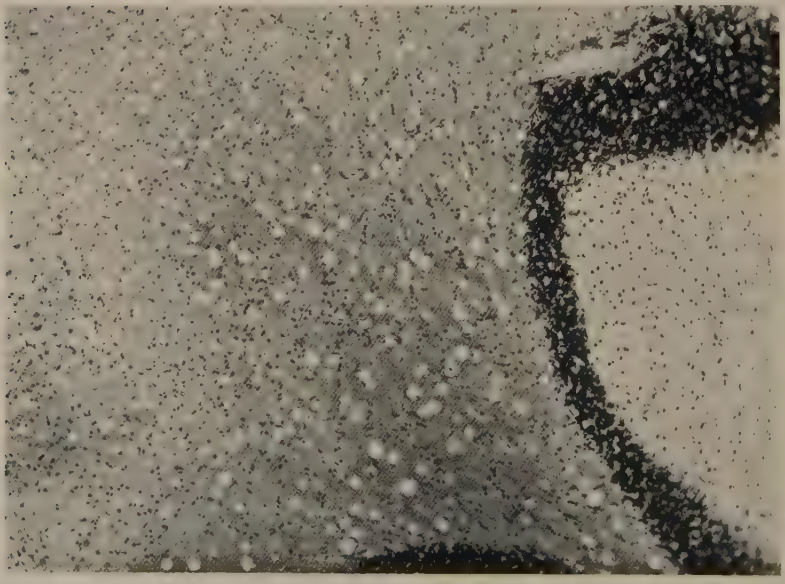


Abb. 4. *Kleinhirn Ratte* nach chron. HCH-Fütterung (32 mg/kg) H.-E.-Färbung. Übersicht, 99× vergrößert: Deutliche Vacuolisierung

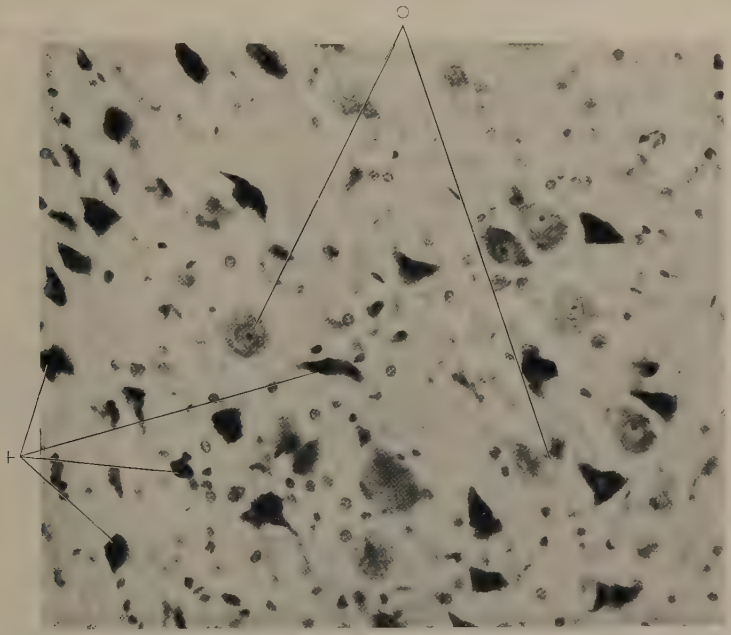


Abb. 5. Nucleus dentatus-Gebiet, Ratte, nach chron. HCH-Fütterung (32 mg/kg), Ausschnitt, 400× vergrößert: NISSL-Färbung + Geschrumpfte, hyperchrome Ganglienzellen, Vacuolisierung einiger Ganglienzellen: ○

Abb. 6. *Kleinhirn Ratte* nach chron. DDT-Fütterung (32 mg/kg) NISSL-Färbung, 396× vergrößert: Geschrumpfte, hyperchrome PURKINJE-Zellen ⊙

rungen darstellen, die sich auch bei den Kontrolltieren fanden. Am quergestreiften Skeletmuskel und am Herzmuskel waren keine Veränderungen erkennbar, vor allem keine Degenerationen und Nekrosen. Die Lungen zeigten starken Blutgehalt. Im Bereich des gesamten Gehirns, vor allem aber im Kleinhirn, konnten wir Vacuolenbildung in der Marksubstanz, in den Zellen des Hirnstammes und vor allem im Kleinhirn Chromatolyse, Zellschrumpfung der Purkinje-Zellen (Nucleus dentatus-Gebiet), Schädigung der kleinen Zellen, Fettablagerungen, Blutungen im Ammonshorngebiet und subarachnoidale Blutungen feststellen, während die gleichalten und mit Ol. Arachidis bzw. Emulsion allein gefütterten Kontrolltiere diese Veränderungen nicht zeigten. Wir haben den Eindruck, daß diese organischen Veränderungen am Gehirn bei den mit *DDT* gefütterten Tieren stärker ausgeprägt waren als bei den mit *Lindan* behandelten. Die histologischen Veränderungen am Groß- und Kleinhirn entsprachen bei beiden Stoffen weitgehend den Befunden, die von Haymaker, Ginzler u. Ferguson, sowie von Pluvinage und Heath bei DDT, allerdings nach chronischer Zufuhr höherer Dosen (100 –350 mg DDT/kg/Tag), beschrieben und von Domenjoz in der Monographie von Müller, Domenjoz, Wiesmann u. Buxdorf zusammengefaßt worden sind.

In der uns zugänglichen Literatur sind bei chron. Verfütterung von *Lindan* wohl histologische Veränderungen an den parenchymatösen Organen (Leber, Niere, Darmschleimhaut, Herz und Lunge) beschrieben, jedoch anscheinend am Gehirn außer einem Ödem keine Veränderungen gesehen worden (Taylor u. Fordsham; Bushland, Wells u. Radeleff), obwohl Lindanspeicherung im Gehirn von Ratten nachgewiesen worden ist (Laug; Davidow-Frawley).

Es sollen daher einige charakteristische histologische Veränderungen, die wir bei den *DDT*- und *Lindan*-Tieren festgestellt haben, in den Abb. 3—6 gezeigt werden.

2. Tägliche Verfütterung von 10 γ Wirkstoff pro Kilogramm Tier in öligen Lösungen mit der Schlundsonde an weiße, männliche Ratten:

1. Mit *DDT*, *Lindan* in Ol. Arachidis über 17 Monate und

2. mit *Aldrin*, *Chlordan*, *Dieldrin* und *Toxaphen* in Ol. Arachidis über 10 Monate. Das entspricht bei einem Rattengewicht von 200—250 g und einer täglichen Nahrungsaufnahme von 20 g einem Futtergehalt von etwa 0,1—0,15 ppm Wirkstoff. Pro Stoff wurden 25 Tiere verwendet. (Über das Resultat des zweiten Teiles dieser Versuche (*Aldrin*, *Chlordan*, *Dieldrin*, *Toxaphen*) wird nach Abschluß der histologischen Untersuchung in einer II. Mitteilung berichtet werden.)

Ergebnisse der Versuche mit DDT und Lindan

a) Erscheinungsbild. In beiden Versuchsreihen mit *DDT* und *Lindan* traten innerhalb der ersten 11 Monate keine auffälligen allgemeinen und nervösen Erscheinungen bei den Ratten auf. Die Tiere nahmen wie die Kontrolltiere normal an Gewicht zu. Danach kam es leider zu einer Stallinfektion (Salmonella), die den Tod der Hälfte der Tiere zur Folge hatte. Letalität und Fertilität können daher in dieser Versuchsreihe nicht beurteilt werden.

b) Hungerungsversuch. Die dreiwöchige Herabsetzung der täglichen Futtermenge auf ein Viertel der normalen bewirkte am Ende der Ver-

fütterung keinerlei nervöse Erscheinungen, die für einen Mobilisierungseffekt sprechen könnten.

c) Sektionsbefunde. Die während der 17 Monate gestorbenen bzw. nach Versuchsende getöteten Tiere zeigten an den parenchymatösen Organen und am Zentralnervensystem keine makroskopischen und mikroskopischen Veränderungen spezifischer Art, lediglich in einigen Fällen waren geringe, durch die Infektion entstandene Erscheinungen festzustellen.

d) Chemische Untersuchung auf DDT und Lindan in den Geweben. Da uns die Lösung der Frage, ob auch bei der angegebenen niedrigen Dosierung von DDT und Lindan nachweisbare Mengen dieser Stoffe in den Rattenorganen gespeichert werden, wichtig erschien, versuchten wir den chemischen Nachweis dieser Insecticide im Körperfett, in der Leber und im Gehirn bei je 10 Ratten. Er erwies sich als sehr schwierig, da die zur Verfügung stehenden Organmengen sehr gering waren. Weiterhin war es nicht einfach, ein geeignetes Lösungsmittel zu finden, das die beiden Stoffe aus den Organen besser herauslöste als das Organfett. Die Abtrennung des störenden Organfettes gelang mit der sogenannten Davidow-Säule.

Wir benutzten Tetrachlorkohlenstoff und bedienten uns zum Teil der von Zeumer u. Neuhaus angegebenen kolorimetrischen Verfahren für DDT und Lindan, die vor allem auf amerikanischen Arbeiten (Barlow, Howard, Schechter-Hornstein u. Schechter-Haller, zit. bei Zeumer-Neuhaus) beruhen, zum Teil der von Mattson, Spillane, Baker u. Pearce sowie von Davidow beschriebenen Methoden. Die Nachweisgrenze lag bei beiden Stoffen, wie Leerversuche ergaben, bei etwa 10 γ, der mittlere Fehler betrug $\pm 10\%$.

Ergebnisse

Es gelang uns weder bei den mit DDT, noch bei den mit Lindan gefütterten Ratten diese beiden Stoffe mit Sicherheit nachzuweisen. Wir glauben, daß dies nicht an der Methodik lag, sondern darauf zurückzuführen ist, daß die beiden Insecticide DDT und Lindan bei der von uns gewählten, für die Praxis bedeutungsvollen niedrigen Dosierung von täglich 10 γ Wirkstoff pro Kilogramm Tier in Fett, Leber und Gehirn der Ratten *nicht* gespeichert werden, wie dies bei höherer Dosierung der Fall ist.

Zusammenfassung

1. Die Toxikologie einiger wichtiger insecticider chlorierter Kohlenwasserstoffe der Diën- und Terpengruppe wird an Hand der Literatur besprochen und mit der von *DDT* und γ-*HCH* (*Lindan*) verglichen.

2. Über akute Toxicitätsprüfungen dieser Stoffe an gezüchteten Stubenfliegen und weißen Ratten wird berichtet.

3. Das Ergebnis chronischer Fütterungsversuche mit *DDT* und *Lindan* an Ratten wird mitgeteilt:

a) 32 mg Wirkstoff/kg Tier täglich über 6 Monate (400 ppm) ergaben deutliche allgemeine und nervöse Erscheinungen, eine bei *Lindan* deutlich höhere Letalität als bei *DDT*, Organveränderungen vor allem an der Leber und im Gehirn. Die Speicherung beider Stoffe konnte an Hand des Mobilisierungseffektes nachgewiesen werden.

b) 10 γ *DDT* und *Lindan*/kg Tier täglich über 17 Monate (0,1 bis 0,15 ppm) führten weder zu allgemeinen, noch zu nervösen Symptomen, histologische Veränderungen wurden nicht beobachtet. Eine Speicherung dieser Stoffe konnte bei dieser Dosierung weder durch Mobilisierungsversuche, noch chemisch nachgewiesen werden.

An dieser Stelle sei unser besonderer Dank ausgesprochen Herrn Prof. Dr. G. Peters, Direktor des Neuropathologischen Institutes der Universität Bonn, und seinen Assistenten Dr. Müller und Dr. Kolmant für die großzügige Unterstützung bei der Herstellung der Gehirnpräparate und der Diagnose der neuropathologischen Veränderungen. Ferner haben wir zu danken Herrn Prof. Dr. Hamperl, Direktor des Pathologischen Institutes der Universität Bonn für die Erlaubnis zur Herstellung der Mikrophotogramme an seinem Institut und Herrn Dozent Dr. Lüchtrath für die Durchsicht der Organpräparate.

Literatur

[1] Agazzi, E. J. et alii: Analyt. Chemistry **25**, 237 (1951). — [2] Alvarez, W. C. and S. Hyman: Arch. of Industr. Hyg. **8**, 480 (1953). — [3] Amann, E.: Canad. J. Biochem. a. Physiol. **32**, 178 (1954). — [4] Amann, E., and H. Kost: Canad. J. Med. Sci. **31**, 146 (1953). — [5] Ambrose, A. M., H. E. Christensen and D. J. Robbins: Arch. of Industr. Hyg. **7**, 197 (1953). — [6] Ards, J. S.: Analyt. Chemistry **20**, 859 (1948). — [7] Ball, W. L., K. Kay and J. W. Sinclair: Arch. of Industr. Hyg. **7**, 292 (1953). — [8] Barnes, J. M.: Trans. Roy. Soc. Trop. Med. (Lond.) **46**, 264 (1952). — [8a] Barnes, J. M.: "Toxic hazards of certain pesticides to man", WHO: Monograph series (Genf) **16**, 129 (1953). — [9] Bateman, G. Q., D. Bidulph, J. R. Harris et alii: Agricult. Chem. **1**, 322 (1953). — [10] Brown, A. W. A.: Insect Control by Chemicals. New York 1951. — [11] Bundren, J., D. E. Howell and V. G. Heller: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **79**, 236 (1952). — [12] Bushland, R. C. et alii: J. Econ. Entomol. **41**, 642 (1948). — [13] Bushland, R. C. et alii: J. Econ. Entomol. **43**, 649 (1950). — [14] Busvine, J. R.: Brit. Med. J. **1952**, 543. — [15] Busvine, J. R.: Trans. Roy. Soc. Trop. Med. (Lond.) **46**, 245 (1952). — [16] Claborn, H. V., J. W. Bowers, R. W. Wells, R. D. Radeleff and W. J. Nickerson: Agricult. Chem. **1953**, H. 8 (ohne Seitenangabe). — [17] Crevier, M., W. L. Ball and K. Kay: Amer. J. Ind. Hyg. **9**, 306 (1954). — [18] Dadey, J. L., and A. G. Kammer: J. Amer. Med. Assoc. **153**, 723 (1953). — [19] Danish, A. A., and R. E. Lidov: Analyt. Chemistry **22**, 702 (1950). — [20] Davidow, B.: J. Assoc. Off. Agricult. Chemists **33**, 130 (1950). — [21] Davidow, B.: J. Assoc. Off. Agricult. Chemists **33**, 886 (1950). — [21a] Davidow, B., and J. P. Frawley: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **76**, 780 (1951). — [21b] Davidow, B., J. L. Radomski and R. Ely: Science (Lancaster, Pa.) **118**, 383 (1953). — [22] Domenjoz, R.: siehe Müller-Domenjoz-Wiesmann-Buxtorf. — [23] Eichler, W.: Pharmazie **5**, 467 (1950). — [24] Fitzhugh, O. G., and A. A. Nelson: J. of Pharmacol. **89**, 18 (1947). — [25] Fitzhugh, O. G., A. A. Nelson and J. P. Frawley: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **100**, 59 (1950). — [26] Frings, H., u. J. E. O'Tousa: Science (Lancaster, Pa.) **111**, 658 (1950). — [26a] Gowdey, C. W., A. R. Graham, J. J. Sequin and G. W. Stavraky: Canad. J. Biochem. a. Physiol. **32**, 498 (1954). — [27] Harris, Th. H.: J.

Assoc. Off. Agricult. Chemists **34**, 672 (1951). — [28] Harris, Th. H.: J. Assoc. Off. Agricult. Chemists **35**, 376 (1952). — [29] Haymaker, M. W., A. M. Gincler u. R. L. Ferguson: Zit. bei Domenjoz. — [30] Heyroth, F. F.: J. Amer. Med. Assoc. **150**, 715 (1952). — [31] Ingle, L.: Arch. of Industr. Hyg. **6**, 357 (1952). — [32] Ingle, L.: Science (Lancaster, Pa.) **118**, 213 (1953). — [33] Ingle, L.: J. Econ. Entomol. **40**, 264 (1947). — [34] Kenyon, W. C.: Analyt. Chemistry **24**, 1197 (1952). — [35] Koernig, N. H. et alii: Amer. Chem. Soc., Boston Meeting, April 1951, (zit. bei Martin and Miles). — [36] Lackay, R. W.: J. Industr. Hyg. a. Toxicol. **31**, 117 (1949). — [37] Laug, E. P.: J. Pharmakol. a. Exper. Ther. **93**, 277 (1948). — [38] Lehman, A. J.: Bull. Assoc. Food a. Drug Off., US, **12**, 82 (1948). — [39] Lehman, A. J.: Bull. Assoc. Food a. Drug Off., US, **13**, 65 (1949). — [40] Lehman, A. J.: Bull. Assoc. Food a. Drug Off., US, **14**, 82 (1950). — [41] Lemmon, G. B. jr., and W. F. Pierce: J. Amer. Med. Assoc. **149**, 1314 (1952). — [42] Lensky, P., and H. L. Evans: J. Amer. Med. Assoc. **149**, 1394 (1952). — [43] Lord, K. A.: Ann. Appl. Biol. **36**, 113 (1949). — [44] Lord, K. A.: Ann. Appl. Biol. **37**, 105 (1950). — [45] Martin, H., and J. R. W. Miles: Guide to the Chemicals used in Crop Protection, Canad. Department of Agriculture, 2. Edition (1953). — [46] Mattson, A. M., J. T. Spillane, C. Baker and G. W. Pearce: Anal. Chemistry **25**, 1065 (1953). — [47] McDevitt, J. B.: J. Assoc. Off. Agricult. Chemists **37**, 633 (1954). — [48] McGee, L. C., H. L. Reed and J. P. Fleming: J. Amer. Med. Assoc. **149**, 1124 (1952). — [49] Meltzer, H.: Nachr.bl. dtsch. Pflanzenschutzdienst **8**, 181 (1954). — [50] Müller, R., R. Domenjoz, R. Wiesmann u. A. Buxtorf: Erg. Hyg. **26**, 5—138 (1949). — [51] Patterson, W. J., and A. J. Lehman: Bull. Assoc. Food a. Drug Off., US, **17**, 3 (1953). — [52] Pfannenstiel, W.: Desinfekt. Ges. Wesen **46**, 71 (1954). — [53] Pluvinage, R. J., u. J. W. Heath: Zit. bei Domenjoz. — [54] Polen, P. B., and P. Silverman: Anlyt. Chemistry **24**, 733 (1952). — [55] Princi, F.: Vortrag 3. Internationaler Kongreß für Phytopharmacy, Paris, Sept. 1952. — [56] Princi, F.: „World Crops", August 1954. — [57] Princi, F., and G. H. Spurbeck: Arch. of Industr. Hyg. **3**, 64 (1951). — [57a] Radomski, J. L., and B. Davidow: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **107**, 266 (1953). — [58] Radeleff, R. D.: Vet. Med. **43**, 342 (1948). — [59] Radeleff, R. D., and R. C. Bushland: J. Econ. Entomol. **43**, 358 (1950). — [60] Riemschneider, R.: Z. Naturforsch. **6** b, 395 (1951). — [61] Riemschneider, R.: Österr. Apoth.Ztg. **5**, 540 (1951). — [62] Riemschneider, R.: Österr. Apoth.Ztg. **6**, 248 (1952). — [63] Riemschneider, R.: Z. angew. Entomol. **33**, 481/600 (1952). — [64] Riemschneider, R.: Z. angew. Entomol. **34**, 101 (1952). — [65] Riemschneider, R.: Z. angew. Entomol. **34**, 405 (1953). — [66] Rogoff, W. M., and R. C. Metcalf: J. Econ. Entomol. **44**, 910 (1951). — [67] Simons, S. W., and M. Andrews: Amer. J. Publ. Health **38**, 624 (1948). — [68] Spiotta, E. J.: Arch. of Industr. Hyg. **4**, 560 (1951). — [69] Stohlman, E. F., W. S. Thorp, and M. J. Smith: Arch. of Industr. Hyg. **1**, 13 (1950). — [70] Stormont, R. T., and B. E. Carley: J. Amer. Med. Assoc. **149**, 1135 (1952). — [71] Taylor, H., and J. Fordsham: Nature (Lond.) **158**, 588 (1946). — [72] Teleky, L.: Arch. Gew. Path. u. Gewerb. Hyg. **13**, 313 (1954). — [73] Treon, J. F. and F. P. Cleveland: Agricult. a. Food Chemistry **3**, 402 (1955). — [74] USA / Public Law 518 / Rules and Regulations Federal Register vom 11. 3. 1955. — [75] Zeumer, H., u. K. Neuhaus: Getreide u. Mehl **3**, 57 (1953).

Privatdozent Dr. Otto R. Klimmer, Bonn, Reuterstr. 2b

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 196—198 (1955)

Von der „Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo", São Paulo, Brasilien

Über die Neutralisation des gerinnungsfördernden Schlangengiftenzyms durch Heparin

Von

D. v. Klobusitzky

(Eingegangen am 30. September 1955)

Vor einigen Jahren hat Verf.[5] über die „in vivo"-Wirkung gerinnungsfördernder pharmazeutischer Präparate berichtet, die als wirksame Grundsubstanz ein in den Giften der *Bothrops*-Arten vorkommendes gerinnungsförderndes Enzym enthalten.

Bekanntlich wird diesem, vom Verf. und seinem Mitarb.[7] zuerst in gereinigtem Zustand hergestellten Ferment eine Thrombin- bzw. thrombinähnliche Wirkung zugeschrieben[1, 2, 6]. In der vorliegenden Veröffentlichung wird über die zwischen diesem Enzym und dem Heparin bestehende Wechselwirkung berichtet, welche als ein indirekter Beweis für die Thrombin- (thrombinähnliche) Wirkung jenes Enzyms betrachtet werden muß. Wie allgemein bekannt ist, wird ja die Wirkung des Thrombins durch Heparin neutralisiert.

Versuchsmaterial

Als gerinnungsförderndes Mittel wurde „*Reptilase*", ein von der Firma „Disperga — Dr. C. Szalágyi" — Wien hergestelltes pharmazeutisches Präparat, welches pro Kubikzentimeter 1 gerinnungsfördernde Einheit[4] enthält, als Heparin das „*Liquémine-Roche*" mit 5000 IE Heparin pro Kubikzentimeter verwendet.

Versuchsanordnung

An Blutproben von Kaninchen, die „Reptilase" und nachher „Liquémine" subcutan bekommen hatten, wurde die Gerinnungszeit mit einer Stoppuhr bestimmt. Um größere Blutverluste zu vermeiden, wurde die Tropfenmethode in feuchter Kammer nach Milian u. Morawitz[3] gewählt. Nach Bestimmung der individuellen Gerinnungszeit wurde den Tieren $^1/_{70}$ cm³, also $^1/_{70}$ gerinnungsfördernde Einheit, pro Kilogramm Körpergewicht in 1 cm³ physiol. NaCl-Lösung subcutan eingespritzt, nach 30 min die Gerinnungszeit erneut festgestellt und anschließend 75, 100, 150 IE pro Kilogramm Körpergewicht von „Liquémine", gleichfalls mit physiol. NaCl-Lösung auf 1 cm³ verdünnt, subcutan injiziert und 30 min nachher die Bestimmung der Gerinnungszeit wiederholt.

Benutzt wurden 6 Kaninchen* in 3 Versuchsserien; zwischen den einzelnen Serien wurde jeweils eine Pause von 2—3 Wochen eingeschaltet.

Die Versuchsresultate zeigten, daß 75 IE von „Liquémine" in 70% der Fälle und 100 oder mehr IE desselben in allen Fällen die „Reptilase"-Wirkung aufhoben.

Als Beispiel werden die Ergebnisse von 2 Versuchsserien, in denen 75 bzw. 100 IE „Liquémine" verabreicht wurden, wiedergegeben.

Tabelle 1. *a) „Liquémine"-Dosis: 75 IE pro Kilogramm Körpergewicht*

	Gerinnungszeit					
	normale		30 min nach „Reptilase"		30 min nach „Liquemine"	
	min	sec	min	sec	min	sec
Kaninchen 1, Körpergewicht 2050 g	2	10	0	30	0	35
„ 2, „ 1630 g	1	37	0	30	3	5
„ 3, „ 2500 g	1	27	0	20	4	
„ 4, „ 2280 g	2	20	0	35	0	25
„ 5, „ 2270 g	2		0	20	5	30
„ 6, „ 2170 g	4	32	1	5	7	20
b) „Liquémine"-Dosis: 100 IE pro Kilogramm Körpergewicht						
Kaninchen 1, Körpergewicht 2060 g	3		0	30	8	
„ 2, „ 1850 g	2		0	30	6	30
„ 3, „ 2280 g	3		0	45	9	
„ 4, „ 2200 g	2	20	0	50	5	20
„ 5, „ 2270 g	2		0	40	6	30
„ 6, „ 1950 g	5	10	1	15	11	

Die geringe Anzahl der verwendeten Tiere gestattet es nicht, *quantitative* Schlüsse zu ziehen, immerhin zeigen sie einwandfrei, daß einerseits das gerinnungsfördernde Ferment der *Bothrops*-Gifte und das Heparin hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Blutgerinnung „in vivo" Antagonisten sind, so daß man — nötigenfalls — die Wirkung des einen mit dem anderen aufheben kann, andererseits zur sicheren Neutralisation von 1 gerinnungsfördernder Einheit des erwähnten Fermentes 7000 IE von Heparin notwendig sind.

Frl. Dr. Astrid Serin, Assistentin der Lehrkanzel f. biologische Chemie soll für wertvolle technische Beihilfe auch an dieser Stelle gedankt werden.

Zusammenfassung

Heparin neutralisiert „in vivo" die Wirkung des in den Giften von *Bothrops*-Arten vorhandenen gerinnungsfördernden Fermentes und

* Es wäre vorteilhafter gewesen, Hunde zu gebrauchen, da diese eine langsamere Gerinnung und außerdem geringere individuelle Schwankungen aufweisen; dem Verf. standen jedoch nur Kaninchen zur Verfügung.

zwar in der Dosis von 7000 IE je gerinnungsfördernder Einheit mit absoluter Sicherheit.

Literatur

[1]Boquet, P.: Venins de serpents et antivenins. Paris: Flammarion 1948. — [2]Fleischhacker, H.: Wien. med. Wschr. **1954**, 171. — [3]Heilmeyer, L., u. H. Begemann: Blut u. Blutkrankheiten, S. 788 (2. Bd. d. Handb. der inneren Medizin, hrsg. von G. v. Bergmann, W. Frey u. H. Schwiegk). Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1951. — [4]Klobusitzky, D. v.: Mem. 1er Congr. Panam. Farm. (La Habana-Cuba), S. 481 (1948). — [5]Klobusitzky, D. v.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 361 (1951). — [6]Klobusitzky, D. v.: Klin. Med. **1954**, 310. — [7]Klobusitzky, D. v., u. P. König: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 387 (1936).

Prof. Dr. med. D. de Klobusitzky, Cx. p., 1036, São Paulo (Brasilien)

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 199—209 (1955)

Aus der Universitäts-Kinderklinik Heidelberg (Prof. Dr. Ph. Bamberger)

Stoffwechselversuche mit verschiedenen markierten Polyphosphaten

Von

K. Schreier* und H. G. Nöller

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. Juli 1955)

Polyphosphate, auch kondensierte Phosphate genannt, werden seit geraumer Zeit in der Nahrungsmittelindustrie verwendet. So dient z. B. das saure Natriumpyrophosphat $Na_2H_2P_2O_7$ seit Jahrzehnten als Säureträger in Backpulvern. Seit etwa 25 Jahren werden Polyphosphate als sogenannte Richtsalze mit großem Erfolg in der Schmelzkäseindustrie angewandt, wo sie zur Stabilisierung der Emulsion aus Eiweiß, Fett und wäßriger Phase unentbehrlich geworden sind. Sie dienen ferner seit längerer Zeit zur Verhinderung der Blutgerinnung und im Zusammenhang damit zur Plasmagewinnung. Neuerdings werden sie auch als Zusatz zur Salzlake für Schinken und zum Wurstbrät für Brüh- und Kochwürste empfohlen.

Es liegt auf der Hand, daß man sich in diesem Zusammenhang mit der Frage der physiologischen Verträglichkeit beschäftigt hat, doch sind die bisher veröffentlichten Versuchsergebnisse unseres Erachtens nicht ausreichend.

Gammel war anscheinend der erste, welcher sich Gedanken über das Schicksal von Metaphosphat im Organismus gemacht hat. Starkenstein sowie Behrens und Seelkopf weisen auf die „relative Ungiftigkeit" der Meta- und Pyrophosphorsäure hin. Shelling nimmt an, daß die Meta- und Hypophosphate biologisch entweder inert sind oder unverändert ausgeschieden werden. Murray und besonders Borenstein u. Schwartz stellten dagegen fest, daß das Natriumsalz der Trimeta- und „Hexameta"phosphorsäure in beträchtlicher Menge resorbiert wird und daß danach die Ausscheidung von Orthophosphat im Urin stark ansteigt. Sie vermuten, daß das Shellingsche Salz sehr schlecht wasserlöslich gewesen sein muß. Schließlich haben Fraser u. Mitarb. gefunden, daß „Natriummetaphosphat" infolge seiner Unlöslichkeit bei Ratten auf P-armer Diät die Phosphatbildung nur in geringem Maße bessert. Neuerdings haben Gillis u. Mitarb. die Frage studiert, ob Calcium- und Natriummetaphosphat als P-Quelle in Frage kommen. Fast all diesen Versuchen haftet der Mangel an, daß die verwendeten Phosphate chemisch schlecht definiert waren.

* Wir sind der Deutschen Forschungsgemeinschaft für eine Sachbeihilfe (Geiger-Zähler) zu großem Dank verbunden.

Bemerkenswerterweise liegen eine größere Zahl von Untersuchungen über das Schicksal von i.v. oder i.m. injizierten, gut definierten Polyphosphaten vor. Gosselin u. Mitarb. fanden z. B. beim Kaninchen, daß linear gebaute Polyphosphate in einem beträchtlichen Ausmaß zu Orthophosphat abgebaut werden, wenn sie in die Blutbahn gebracht wurden. Cyclische Metaphosphate dagegen sollen kaum hydrolysiert werden. Über Versuche mit markierten Polyphosphaten bei parenteraler Gabe haben Götte, Götte u. Frimmer sowie Pfleger u. Frimmer berichtet. Hier handelt es sich aber um pharmakologische Fragestellungen, welche für den Ernährungswissenschaftler nicht ausschlaggebend sind.

Zur Entscheidung darüber, ob der Zusatz der bisher in der Nahrungsmittelindustrie üblichen Polyphosphate zu menschlichen Lebensmitteln unbedenklich oder gefährlich ist, schien uns die Beantwortung folgender Fragen von grundsätzlichem Interesse:

1. Werden Polyphosphate überhaupt resorbiert?
2. Wenn ja, in welcher Form werden sie aufgenommen?
3. Spielt die Molekülgröße eine Rolle?
4. Kommen ihnen spezifische toxische Eigenschaften zu?

Es war in diesem Zusammenhang also auch zu untersuchen, ob der Makroorganismus Fermente besitzt, um die nahrungsmittelüblichen höherkondensierten Phosphate zu niederpolymeren Phosphaten oder Orthophosphat aufzuspalten, nachdem bereits bekannt war, daß im Säugetierorganismus Pyrophosphatasen und auch Metaphosphatasen vorkommen (s. Ingelman, Sumner u. Somers u. a.).

Methodik

Unsere sämtlichen Versuche wurden mit P^{32}-markierten Polyphosphaten vorgenommen. Die Substanzen wurden uns in liebenswürdiger Weise von Herrn Dr. Gehrig, Phosphatlaboratorium der Fa. Joh. A. Benckiser GmbH, Chemische Fabrik, Ludwigshafen a. Rh., zur Verfügung gestellt und zwar handelt es sich um: 1. Natriumpyrophosphat $Na_4P_2O_7$; 2. Natriumtripolyphosphat $Na_5P_3O_{10} \cdot 6\,H_2O$; 3. ein Natriumpolyphosphat mit 62% P_2O_5, „$Na_7P_5O_{16}$" im nachfolgenden kurz Polyphosphat 62 genannt; 4. „Natriumhexametaphosphat" Graham-Salz [$(NaPO_3)_x \cdot H_2O$].

Während Pyro- und Tripolyphosphat einheitliche chemische Verbindungen darstellen, handelt es sich bei Polyphosphat $Na_7P_5O_{16}$ und [$(NaPO_3)_x \cdot H_2O$] um ein Gemisch polymer-homologer Verbindungen, die bisher nur papierchromatographisch aufzuteilen waren.

Herstellung der Phosphate. Die polymeren Phosphate wurden nach dem Standardverfahren[1] in Gold-Platinschalen aus aus einem Gemisch von P^{31} und trägerfreiem P^{32} dargestellt. Ihre spez. Aktivität betrug 1,3—1,5 mCg. Ihre Identität und Reinheit wurde papierchromatographisch getestet.

Die jeweilige Verbindung wurde mit der Schlundsonde in einer Menge von 30 mg P^{32}-haltigem Phosphat (13—20 mg Gesamt-P_2O_5-Gehalt), welche in 1 g

[1] Einzelheiten über die Herstellung der Phosphate können von den Autoren angefordert werden.

Magermilchkäse und 3 cm³ Magermilch gelöst war, an um 200 g schwere Ratten verabfolgt. Nach entsprechendem Zeitabstand (12—24 Std) entbluteten wir die Tiere und bestimmten die Radioaktivität in folgenden Organen: Leber, Magen + Darm, Gehirn und Knochen (Femur + Tibia + Fibula, rechtes Hinterbein sorgfältig präpariert[1]). Ferner wurde nach Trichloressigsäureenteiweißung des Blutes im Überstehenden (säurelösliches Phosphat) die Impulszahl bestimmt. Das Sediment (Erythrocyten und Bluteiweißkörper) ebenso wie die anderen Organe veraschten wir mit konzentrierter Schwefelsäure, brachten nach geeigneter Verdünnung je 1 cm³ in Schälchen ein, trockneten und bestimmten mit einem üblichen Geiger-Müller-Zählrohr (Glockenzählrohr) die Impulszahl. Als Zählgerät wurde das von Friesecke u. Höpfner neu entwickelte FH 49 verwendet. Die unten angegebenen Werte sind durchweg durch Doppel- oder Dreifachbestimmung gesichert.

Es ist noch zu erwähnen, daß wir bei den Tieren versuchten, durch Verschluß der Analöffnung die Verunreinigung des Urins durch Stuhl unmöglich zu machen. Dies ist nicht immer gelungen.

Zur chromatographischen Analyse der in die Organe inkorporierten Phosphate wurde die Leber homogenisiert und dann, wie auch das Blut, mit Trichloressigsäure versetzt.

Nach hochtourigem Abzentrifugieren entfernten wir die Trichloressigsäure durch dreimaliges Ausäthern und führten der wäßrigen Lösung einen Tropfen 10%ige NaOH zu, um eine schwach alkalische Reaktion der überstehenden Lösung zu gewährleisten (zur Verhütung der Depolymerisation der Phosphate).

Die *papierchromatographischen Untersuchungen* erfolgten nach der Methode von Grunze u. Thilo. Anschließend wurden die fertig entwickelten Chromatogramme autoradiographiert (Belichtungszeit 7 Tage). Hierbei waren die Flecken der als Vergleichstestlösungen mitgelaufenen inaktiven Phosphate (Ortho-, Pyro- und Tripolyphosphat) nach dem Entwickeln des Chromatogrammes durch Betupfen mit einer markierten Phosphatlösung aktiviert worden.

Durchführung der Versuche

1. *Im Blut.* In jeweils etwa 10 ml Blut eines frisch getöteten Tieres wurde das Eiweiß mit 15 ml 20%iger kalter Trichloressigsäure ausgefällt und zentrifugiert. Nach Abdekantieren und Ausäthern der Trichloressigsäure haben wir die wäßrige Lösung mit NaOH auf ein p_H von 9—10 eingestellt. Anschließend wurde im Vakuum bei etwa 35° auf etwa $^1/_{10}$ des ursprünglichen Volumens eingeengt und chromatographiert.

2. *Leber.* Die Leber wurde homogenisiert und in analoger Weise mit Trichloressigsäure aufgearbeitet.

3. *Bakterienversuche.* Zusammensetzung des Mediums: Eiweißhydrolysat („Sangamin Benckiser") 1,0; Natriumacetat 1,2; Glucose 2,0; KH_2PO_4 0,1; K_2HPO_4 0,1; Salzlösung C ($MnSO_4$, $MgSO_4$, $FeSO_4$, NaCl) für Lactobacillen (siehe b. Schreier!) 4 ml ad 100,0 aqua dest. Der Bakteriennährlösung war markiertes Pyrophosphat, Tripolyphosphat und Polyphosphat 62 zugesetzt worden. Nach Abzentrifugieren der Nährlösung wurden in einem Teil derselben bei p_H 8—9 die Phosphate mit Bariumchlorid ausgefällt. Die hierbei auftretende schwache Trübung wurde, nachdem sie sich nach einigen Stunden abgesetzt hatte, abgesaugt und der Niederschlag mit 1—2 Tropfen n/10 HCl auf einem Uhrglas gelöst und chromatographiert. Ein anderer Teil der Nährlösung wurde im Vakuum bei 35° eingeengt und anschließend chromatographiert.

Kontrolle. Je 10 ml Rattenblut von je einem Tier, das keine Phosphate erhalten hatte, wurden mit Trichloressigsäure enteiweißt und dann je 150 mg Pyro-,

[1] Wir danken unserem Laboranten E. Lutz für seine Mithilfe.

Tripoly- und „Tetrapoly"phosphat zugesetzt (ein dem Polyphosphat 62 analoges mittelpolymeres Phosphat von 61,4% P_2O_5). Dann wurde die Trichloressigsäure ausgeäthert, auf ein p_H von 9—10 eingestellt und im Vakuum bei 35°C auf etwa $^1/_{10}$ des Ausgangsvolumens eingeengt. Anschließend erfolgte die papierchromatographische Aufarbeitung. Die Phosphate ergaben hierbei jeweils ihr ursprüngliches Chromatogramm, waren also unter den Versuchsbedingungen nicht abgebaut worden.

Zur Klärung der Frage, ob die Darmbakterien Polyphosphatasen enthalten, wurde vom kalten Medium, das P^{32}-markiertes Polyphosphat enthielt, abzentrifugiert und mehrfach gewaschen. Nach der Trocknung bis zur Gewichtskonstanz wurden die Bakterien mit Schwefelsäure aufgeschlossen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie oben angegeben.

Darmphosphatasen. Bei den Versuchen zum in vitro-Aufschluß der Polyphosphate verwendeten wir Dünndarmschleimhaut vom Kalb und Mensch (Operationspräparat). Der Fermentansatz bestand aus Acetat- oder Veronalpuffer von p_H 5,6 bzw. 7,2 unter Zusatz von markiertem Polyphosphat und der homogenisierten Schleimhaut. Die Inkubationsdauer betrug 2 Std, als Kontrolle wurde ein völlig identischer Ansatz mitlaufen gelassen, nur daß die Schleimhautsuspension erst nach Zugabe der Trichloressigsäure zugesetzt wurde. Nach dem Ausäthern führten wir auch hier chromatographische Untersuchungen durch.

Ergebnisse

1. Resorptionsversuche. In Tab. 1 sind die Ergebnisse der ersten Versuchsserie wiedergegeben. Je eine Ratte wurde nach 12 und 24 Std getötet. Die applizierte Dosis pro Tier betrug:

bei Natriumpyrophosphat 4420000 Impulse/Minute/Tier
„ Polyphosphat 62 4370000 „ „ „
„ Graham-Salz 4300000 „ „ „

Tabelle 1. *P^{32}-Gehalt im Urin, Stuhl, Blut und verschiedenen Organen bei Ratten nach peroraler Polyphosphat-Zufuhr in Impulsen/Minute*

		nach 12 Std	nach 24 Std
Leber	Pyrophosphat	191800	210000
	Polyphosphat 62	169000	186000
	Graham-Salz	33500	82500
Knochen	Pyrophosphat	28500	49400
	Polyphosphat 62	33600	36800
	Graham-Salz	6290	17400
Gehirn	Pyrophosphat	800	10200
	Polyphosphat 62	600	5000
	Graham-Salz	0	3000
Erythrocyten und Proteine in 10 ml Blut	Pyrophosphat	640	2600
	Polyphosphat 62	2980	3540
	Graham-Salz	0	2450
säurelösliches Phosphat in 10 ml Blut	Pyrophosphat	1180	2135
	Polyphosphat 62	1840	1620
	Graham-Salz	430	1028
Magen und Darm	Polyphosphat 62	1870000	Stuhlverlust
	Graham-Salz	3115000	„
Urin	Pyrophosphat	440000	d. Stuhl verunr.
	Polyphosphat 62	340000	„ „ „
	Graham-Salz	32000	„ „ „

In einem zweiten Versuch erhielten 3 Ratten etwa 30 mg Polyphosphat entsprechend je 4850000 Impulsen/Minute mit der Schlundsonde in Form von Tripolyphosphat. Die Tiere wurden alle nach 12 Std getötet.

Tabelle 2. *Verteilung von P^{32} im Rattenorganismus nach peroraler Zufuhr von markiertem Tripolyphosphat. Die Werte stellen Impulse/Minute dar*

	Leber	Knochen	Gehirn	Darm	Urin
I. Ratte . . .	372000	80000	12000	1460000	945000
II. Ratte . . .	495000	85000	10740	1384000	705000
III. Ratte . . .	289500	75000	3500	Stuhlverl.	Stuhl verunreinigt

	Erythrocyten	säurelösliches Phosphat
I. Ratte . . .	3700	7460
II. Ratte . . .	3920	5080
III. Ratte . . .	3550	4160

In einer dritten Serie wurden 7 Ratten verwendet. Die Entblutung der Tiere erfolgte nach 18 Std. Die Ratten erhielten die Polyphosphate wie vorher in Magermilchkäsemilieu. Folgende Impulszahlen/Minute wurden appliziert:

Pyrophosphat	2050000
Polyphosphat 62	2080000
Graham-Salz	2010000
Tripolyphosphat	2420000

Tabelle 3

Polyphosphate		Leber	Knochen	Gehirn	Darm	Urin	Erythrocyten	säurelösl. Phosphat
Pyrophosphat .	1.	286000	14200	3000	905000	427000	—	1450
„ .	2.	153500	33300	3250	600000	391000	3100	2050
Tripolyphosphat		279000	36800	3750	955000	538000	3250	2750
Polyphosphat 62	1.	167000	24000	—	830000	390000	3200	2235
„	2.	119000	54600	2050	648000	—	3170	2505
Graham-Salz .	1.	63050	1675	1125	1425000	85800	2840	1072
„ „	2.	63800	4450	2000	1324000	81900	2500	1230

Bei der Beurteilung der Werte ist zu berücksichtigen, daß die Entblutung der Tiere nicht immer optimal glückte, so daß der Blutgehalt des Gehirnes die Werte zu einem gewissen Grade beeinflußt hat. Dasselbe trifft — wenn auch in einem weit geringeren Maße — für die Leber zu. Der Urin wurde nur dann berücksichtigt, wenn wirklich keinerlei Stuhlpartikel darin nachweisbar waren. Bei der Veraschung haben wir besonders darauf geachtet, daß keine Verluste entstanden.

Aus unseren Resorptionsversuchen ergibt sich demnach, daß die 4 untersuchten kondensierten Phosphate von der Ratte je nach Art des Phosphates verschieden resorbiert werden. Die niedriger molekularen werden rascher aufgenommen als die höher-molekularen. Nach 18 Std findet sich Graham-Salz z. B. noch zu mehr als 60% im Darmkanal. Nach Götte wird das noch höhermolekulare „Tamann-Salz" überhaupt nicht resorbiert.

2. Art der resorbierten Phosphate. Nachdem somit feststand, daß diese Polyphosphate irgendwie resorbiert werden, war die Frage zu beant-

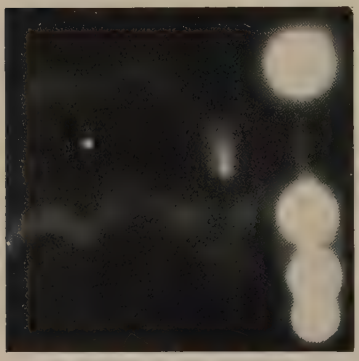


Abb. 1. Chromatogramm enteiweißter Serumfiltrate 6, 12 u. 24 Stunden (von links nach rechts) nach peroraler Zufuhr von Poly 62. Rechts von oben nach unten Orthophosphat, Pyrophosphat, Tripolyphosphat und Poly 62 als Testsubstanzen

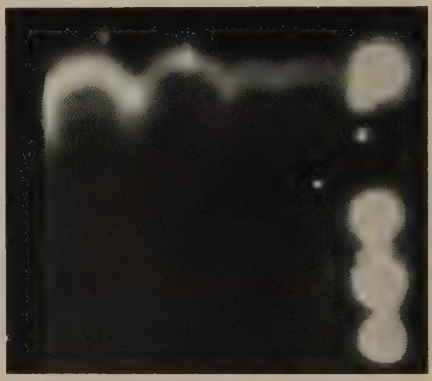


Abb. 2. Chromatogramm von Leberhomogenaten nach Verabreichung von Poly 62; 6, 12 und 24 Stunden nach der Zufuhr. Rechts Testsubstanzen

worten, in welcher Form dies geschieht. Wir gingen so vor, daß nach einer entsprechenden peroralen Dosis der Polyphosphate die Tiere vollständig entblutet wurden und im Blut sowie in der Leber papierchromatographisch die Art des vorhandenen Phosphates festgelegt wurde. Die folgenden Abbildungen zeigen

1. ein Blutchromatogramm nach Zufuhr des Polyphosphates 62 und

2. ein Chromatogramm eines Leberhomogenisates nach Verabreichung von Polyphosphat 62.

Die Chromatogramme der Belastungen mit den übrigen Polyphosphaten hatten ein völlig gleichsinniges Ergebnis, so daß auf ihre Wiedergabe verzichtet werden kann.

Grundsätzlich fanden wir im Blut vor allem radioaktives Orthophosphat und eine geringe Menge Pyrophosphat. In der Leber konnte das markierte Phosphat ausschließlich als Orthophosphat identifiziert werden. Damit ist der für unsere Fragestellung überaus wichtige Beweis geführt, daß die höherpolymeren Phosphate als solche überhaupt nicht

die Darmwand durchdringen oder jedenfalls nur in derart geringen Mengen, daß sie sich sogar der hochempfindlichen Markierungstechnik entziehen. Pyrophosphat wird in einem gewissen Ausmaße als solches aufgenommen.

Es ist nicht nur sehr wahrscheinlich, sondern praktisch als bewiesen anzusehen, daß Pyrophosphat ebenso wie Triphosphat im Intermediärstoffwechsel eine bedeutsame Rolle spielt. Dafür spricht erstens das Vorhandensein von zahlreichen spezifischen Fermenten, welche Pyrophosphat hydrolysieren, und ferner u. a. der Nachweis von Pyrophosphat am Coenzym A-Molekül, welcher von LIPMANN u. Mitarb. geführt wurde. Demnach kann Pyrophosphat nicht als körperfremde Substanz angesehen werden. Es wird außerdem besonders von der Erythrocytenphosphatase (s. z. B. bei SJÖBERG) rasch gespalten[1].

Über die enzymatische Hydrolyse von kondensierten Phosphaten lagen schon einige Beobachtungen vor. GOSSELIN, ROTHSTEIN, MILLER u. BERKE fanden, daß die linearen Polymeren Tripolyphosphat und Graham-Salz („Hexametaphosphat") im Blut zu Orthophosphat hydrolysiert werden. Weitere Studien hat MATTENHEIMER vorgenommen. Er kommt zum Ergebnis, daß nicht nur Pyrophosphat, sondern auch Tri- und Tetrapolyphosphat von verschiedenen Organextrakten aufgespalten werden. Dagegen erfolgt keine Aufspaltung des Grahamschen Salzes durch Menschenniere. MATTENHEIMER postuliert eine Verschiedenheit von Polyphosphatasen und Metaphosphatasen.

Tabelle 4. *P^{32} Inkorporation von Darmbakterien aus Polyphosphaten nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen*

Polyphosphate	Impuls/Minute/ml Medium	Impuls/10 mg Bakterien Trockensubstanz
Pyrophosphat . . .	6310	2734
Polyphosphat 62 . .	5610	2374
Tripolyphosphat . .	9954	4178

Die von uns durchgeführte Spaltung der Polyphosphate mit Dünndarmschleimhaut von Kalb und Mensch stellt eine Ergänzung dieser älteren Ergebnisse dar. In den 4 nachfolgenden Abbildungen sind unsere Ergebnisse in Form der Photographien unserer Chromatogramme dargestellt. Abbildungen 3, 4, 5 und 6.

Es ergab sich, daß Tripolyphosphat sowohl im saueren als auch alkalischen Bereich bereits nach 2 Std Inkubation weitgehend zu Orthophosphat hydrolisiert wurde.

Dasselbe gilt auch für das sogenannte Polyphosphat 62, wobei offenbar die Spaltung bei p_H 7,2 deutlich stärker erfolgt ist als im sauren Bereich. Eine Hydrolyse vom Graham-Salz ist bei p_H 7 deutlich

[1] Phosphoribosylpyrophosphat nimmt eine zentrale Stellung bei der Pyrimidin-Nucleotidsynthese ein (A. KORNBERG, J. LIEBERMAN and E. S. SIMMS; J. of Biol. Chem. **215**, 389—403, 417 (1955).

nachweisbar, während sie bei p_H 5,6 nur sehr gering ist. Pyrophosphat wird fast völlig in Orthophosphat überführt.

Die weitere Ergänzung des Fragenkomplexes um den Stoffwechsel der Polyphosphate ergibt sich aus dem Versuch mit Darmbakterien in Tab. 4. Sie zeigt, daß die (im einzelnen nicht weiter differenzierten) Darmbakterien P^{32} aus Polyphosphaten mit einer geradezu erstaunlichen Avidität aufnehmen.

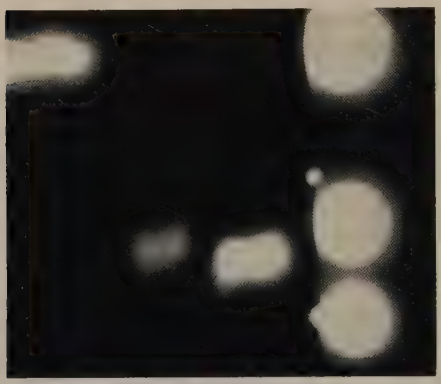


Abb. 3. Chromatogramm einer Pyrophosphatlösung nach Inkubation mit Darmphosphatase: Links inkubierte Pyrophosphatlösung (nur Orthophosphat), Mitte Kontrolle in 2 Konzentrationen, rechts Testsubstanzen (Ortho-Pyro- und Tripolyphosphat in der Reihenfolge von oben)

Abb. 4. Chromatogramm einer Tripolyphosphatlösung nach Inkubation mit Darmphosphatase. Links inkubierte Lösung in 2 Konzentrationen. Mitte 2 Kontrollen. Rechts Testsubstanzen

Die Bakterien inkorporieren aber nicht nur Phosphat aus obigen Polyphosphaten, sondern nach der Inkubation war das noch im Medium vorhandene Phosphat praktisch zu Orthophosphat hydrolysiert. Überträgt man diese Versuche auf den Darm, so scheint die Annahme berechtigt, daß die Darmbakterien neben den Polyphosphatasen der Schleimhaut recht intensiv bei der Spaltung der Polyphosphate mitwirken.

Diskussion

Das Vorkommen verschiedener Polyphosphate im Tier- und Pflanzenreich läßt vermuten, daß ihnen im Intermediärstoffwechsel eine Rolle zukommt. Polymeres Metaphosphat findet sich besonders in der Hefe (Schmidt u. Mitarb.) und wurde dort bereits im Jahre 1893 von Kossel entdeckt (siehe auch bei Ebel!). Im Säugetierorganismus gehören Pyro- und Tripolyphosphat zweifelsohne zu den physiologisch vorkommenden Verbindungen. So entsteht Pyrophosphat

offenbar aus energiereichem Phosphat, und zwar über Acetyl-Co A (Jones u. Mitarb., Flynn u. Mitarb.). Das „Cyclophorasesystem" reichert unter bestimmten Bedingungen Pyrophosphat an (Cross u. Mitarb., Lindenberg u. Ernster). Als Metall-Komplexsalzbildner hemmt es verschiedene Fermente (z. B. die Succinodehydrase) und reaktiviert andere (Aldolase usw.) (siehe z. B. Breusch).

Ob höhere Polymerisationsstufen der Phosphorsäuren im Intermediärstoffwechsel entstehen können, ist nicht sehr wahrscheinlich, aber kann nicht endgültig verneint werden. Vielleicht können sie dort auch als energiereiche Phosphatverbindungen verwertet werden. Roux u. Mitarb. finden, daß z. B. Trimetaphosphat die Blutmilchsäure zum Ansteigen bringt.

Unsere Untersuchungen haben jedenfalls gezeigt, daß Tripolyphosphat, Polyphosphat 62 und Graham-Salz als solche nicht resorbiert

Abb. 5

Abb. 6

Abb. 5. Chromatogramm einer Poly-62-Lösung nach Inkubation mit Darmphosphatase. Links inkubierte Lösung in 2 Konzentrationen. Mitte 2 Kontrollen. Rechts Testsubstanzen

Abb. 6. Chromatogramm einer Grahamsalzlösung nach Inkubation mit Darmphosphatase. Links inkubierte Lösung in 2 Konzentrationen (beachte links oben das Orthophosphat!). Mitte 2 Kontrollen. Rechts Testsubstanzen

werden, sondern durch Depolymerasen der Schleimhaut und der Bakterien gespalten und als Ortho- bzw. in geringeren Mengen als Pyrophosphat aufgenommen werden. Die pharmakologischen Wirkungen, die ihnen zu eigen sind, können demnach bei peroraler Zufuhr nicht wirksam werden. Die Befürchtung, daß durch den Genuß von polyphosphathaltigen Nahrungsmitteln toxische Schädigungen im Makroorganismus eintreten können, erscheint uns daher unbegründet.

Es erhebt sich allerdings noch die Frage, ob bei einer solchen Ernährungsweise die Calciumphosphatbilanz verschlechtert wird. Da das Calcium auch aus Calciumorthophosphat resorbiert wird und die Polyphosphate, wie wir oben gezeigt haben, großenteils schon im Darm in Orthophosphat übergehen, bestehen zunächst keine grundsätzlichen Bedenken, daß die Calciumresorption in Gegenwart von kondensierten Phosphaten verschlechtert wird. Es finden sich im Gegenteil in der Literatur Angaben darüber, daß sie durch Polyphosphate verbessert wird (s. Borenstein u. Schwartz, Jones, Black u. Vance). Wir sind uns jedoch darüber im klaren, daß die Frage der Calciumresorption von vielen Faktoren abhängt.

Zusammenfassung

Es wird über Stoffwechselversuche mit markierten Polyphosphaten berichtet. Bei Ratten wurde die Resorptions- und Inkorporationsrate von P^{32}-markiertem Pyrophosphat, Tripolyphosphat, Graham-Salz und Polyphosphat 62 studiert. Es ergab sich, daß alle untersuchten Polyphosphate in Abhängigkeit von ihrer Konstitution zu einem mehr oder minder hohen Prozentsatz aufgenommen werden. Am geringsten war die Resorptions- und Inkorporationsrate von Graham-Salz. Bei der papierchromatographischen Differenzierung der Filtrate von Blut und Leber ergab sich, daß praktisch nur Orthophosphat zur Resorption gelangt und daneben lediglich noch Pyrophosphat nachweisbar ist.

Mit Hilfe von Homogenaten aus Darmschleimhaut von Kalb und Mensch wurde nachgewiesen, daß sowohl bei p_H 5,6 als auch bei p_H 7,2 eine Aufspaltung zu Orthophosphat erfolgt mit Ausnahme von Graham-Salz, das bei p_H 5,6 nur sehr gering, bei p_H 7 aber doch deutlich hydrolysiert wird.

Darmbakterien aus Rattenstuhl inkorporieren und hydrolysieren die von uns untersuchten Polyphosphate.

Literatur

Behrens, B., u. K. Seelkopf: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **169**, 238 (1933). — Borenstein, M. K., and C. Schwartz: J. Nutrit. **36**, 681 (1948). — Cross, R. J., J. V. Taggart, G. A. Covo and P. E. Green: J. of Biol. Chem. **177**, 655 (1949). — Ebel, J. P.: Bull. Soc. Chim. Biol. **34**, 321 (1952). — Flaschenträger-Lehnartz: Physiol. Chemie Bd. 2a. Springer 1954. — Flynn, R. M., M. E. Ellen

and F. Lipmann: J. of Biol. Chem. **211**, 721 (1954). — Fraser, H. F., E. R. Smith and W. C. White: Publ. Health. Rep. **1946**, 1810. — Gammel, M. G.: Schweiz. Wschr. chem. u. pharm. **39**, 302 (1901). — Gillis, M. B., L. C. Norris and G. F. Heuser: J. Nutrit. **52**, 114 (1954). — Götte, H.: Z. Naturforsch. 8b, 175 (1953). — Götte, H., u. M. Frimmer: Z. Naturforsch. 8b, 612 (1953); Angew. Chem. **65**, 52 (1953). — Gosselin, R. E., C. S. Tidball, E. Magirian, P. E. A. Maynard, W. L. Dows and H. C. Hodge: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **108**, 117 (1953). — Gosselin, R. E., A. Rothstein, G. J. Miller and H. L. Berke: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **106**, 180 (1952). — Grunze, H., u. E. Thilo: Sitzungsberichte der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, 1954. — Ingelman, B.: in Sumner and Myrbäck: The enzymes; Bd. 1, S. 511 ff. New York: Academic Press 1951. — Jones, M. E., S. Black, R. M. Flynn and F. Lipmann: Biochim. et Biophysica Acta N. Y. **12**, 141 (1953). — Kossel, A.: Arch. f. Anat. **1893**, 160. — Lindberg, O., and L. Ernster: Exper. Cell. Res. **3**, 209 (1952). — Mattenheimer, H.: Biochem. Z. **322**, 36 (1951). — Murray, D. E.: Dissertation North. Western University Chicago, Ill. (1937). — Pfleger, K., u. M. Frimmer: Arzneimittel-Forsch. **154**, 646. — Roux, H., et M. J. Francillon: II. int. Congr. Biochemie Paris 1952, S. 441. — Schmidt, G., L. Hecht and S. J. Thannhauser: J. of Biol. Chem. **166**, 775 (1946). — Schreier, K.: Biochem. Z. **320**, 497 (1950). — Schwartz, C., K. K. Jones, T. W. Mack and R. W. Vance: J. Dairy. Sci. **23**, 19 (1940). — Shelling, D. H.: J. of Biol. Chem. **96**, 195 (1932). — Sjöberg, K.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **32**, 191 (1954). — Starkenstein, E.: Biochem. Z. **32**, 257 (1911). — Sumner, J. B., and G. F. Somers: Chemistry and methods of enzymes. New York: Academic Press 1953. — Wiame, J. M.: Biochim. et Biophysica Acta **1**, 234 (1947).

Dozent Dr. K. Schreier, Universitäts-Kinderklinik Heidelberg

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 210—211 (1955)

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering AG, Berlin-West

Über protrahiert wirksame Androgene*

Von

M. Schenck und K. Junkmann

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 18. August 1955)

In einer vorangehenden Mitteilung konnte über die Beeinflussung von Wirkungsdauer und Intensität bei Androgenen durch Veresterung mit Fettsäuren verschiedener Kettenlängen berichtet werden. Die Frage des

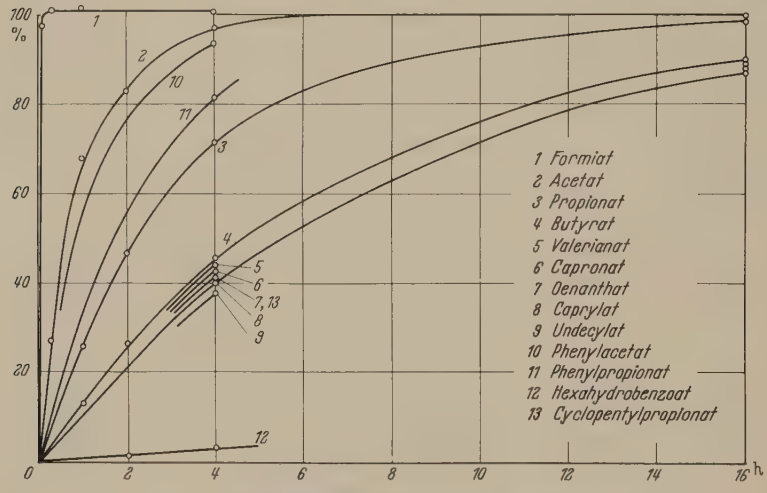


Abb. 1. Verseifungsgeschwindigkeiten von Testosteronestern

Wirkungsmechanismus wurde dabei offengelassen und als eine Möglichkeit diskutiert, daß die verschiedene Verseifungsgeschwindigkeit Ursache der Verlängerung der Wirkung sein könnte.

Als Beitrag zur Klärung dieser Frage haben wir die Verseifungsgeschwindigkeit verschiedener Testosteronester in wäßriger alkoholischer Kalilauge (5,0 cm³ Äthylalkohol + 1,00 cm³ n/1 wäßrige KOH) bei 20,0° C bestimmt. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Abbildung wiedergegeben.

Es zeigt sich, daß mit zunehmender Länge der veresternden Fettsäurekette die Verseifungsgeschwindigkeit abnimmt. Andererseits liegen

* Herrn Professor Dr. W. Schoeller zum 75. Geburtstag gewidmet.

jedoch die Verseifungsgeschwindigkeiten von Testosteronbutyrat, -capronat, -oenanthat, -caprylat und -undecylat so nahe beieinander, daß man durch die verschieden leichte Verseifbarkeit allein die doch recht erheblichen Unterschiede hinsichtlich Wirkungsintensität und -dauer, wie sie mindestens bezüglich Butyrat, Oenanthat und Undecylat bestehen, kaum erklären kann. Auch die Ester mit Hexahydrobenzoesäure, Phenylessigsäure und Phenylpropionsäure ordnen sich nicht entsprechend ihrer Wirkungsdauer und Intensität in das Bild ein, während das Cyclopentylpropionat mindestens in der Nähe des optimal wirksamen Oenanthats liegt.

Bei der Beurteilung der mitgeteilten Kurven ist zu berücksichtigen, daß neben der eigentlichen Verseifungsreaktion in untergeordnetem Maße noch eine Umesterung des Steroidesters mit dem Lösungsmittel unter Bildung von Fettsäureestern des Äthylalkohols erfolgt, wodurch jedoch das Gesamtbild sich grundsätzlich nicht ändert.

Zusammenfassung

Es werden Verseifungsgeschwindigkeiten verschiedener Testosteronester mitgeteilt und mögliche Beziehungen zu ihrer physiologischen Wirkung diskutiert.

Bei der technischen Durchführung der Versuche erfreuten wir uns der Mitarbeit von Herrn Heinz Wieglepp.

Literatur

Junkmann, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 85 (1952).

Dr. M. Schenck, Berlin N 65, Hauptlaboratorium d. Schering AG, Müllerstr. 170/2

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 212—213 (1955)

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering A.G. Berlin-West

Über protrahiert wirksame Corticoide*

Von

K. Junkmann

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 18. August 1955)

In vier vorangehenden Mitteilungen[1] wurde über die Beeinflussung der Wirkungsdauer von Steroidhormonen, der Androgene, Oestrogene, Gestagene und Corticoide durch Veresterung mit verschieden langen Fettsäureketten berichtet. Als Corticoide wurden in der letzten Mitteilung Cortison und seine Ester sowie Dihydrocortison und dessen Ester, also Glucocorticoide, untersucht, wobei als Maß der Wirkung die Verringerung des Thymusgewichtes gewählt wurde.

Es bliebe noch zu untersuchen, ob auch die Mineralocorticoide durch Veresterung eine Verlängerung ihrer Wirkungsdauer erfahren. Zur Untersuchung der Mineralocorticoidwirksamkeit eignet sich der Thymusgewichtstest nicht, da durch Desoxycorticosteron das Thymusgewicht eher erhöht wird. Es wurde daher der Überlebenstest an dem als besonders geeignet von Küchmeister[2] vorgeschlagenen Goldhamster gewählt.

Versuchstechnik

Gruppen von männlichen Goldhamstern im Durchschnittsgewicht von 50—60 g wurden vom Rücken her in Äthernarkose epinephrektomiert. Sofort im Anschluß an die Operation erhielten die Tiere einmalig 20 mg der Testsubstanz in 0,5 cm^3 Sesamöl gelöst je Tier subcutan. Die Tiergruppen umfaßten meist 20 Tiere, nur Desoxycorticosteroncaprylat und -capronat sind mit je 10 Tieren belegt, während Desoxycorticosteronönanthat mit einer Versuchsgruppe von 30 Tieren und die Kontrollen mit 50 Tieren belegt sind. Im weiteren Verlauf wurde die Absterbekurve des Tierkollektivs ermittelt. Einige wenige Tiere, die unwahrscheinlich lange Zeit überlebten, ohne Gewicht zu verlieren, sind von der Beurteilung ausgeschaltet und erwiesen sich als mangelhaft operiert.

Ergebnisse

Die Ergebnisse sind aus den nachstehenden graphischen Darstellungen abzulesen. Aus ihnen geht hervor, daß die Kontrollen,

* Herrn Professor Dr. W. Schoeller zum 75. Geburtstag gewidmet.

wie von KÜCHMEISTER festgestellt, innerhalb 9 Tage sterben und daß die Zeitdauer, bis zu der 50% der Tiere nach der Operation leben bleiben, etwa 5 Tage beträgt.

Die Veresterung des Desoxycorticosterons in 21-Stellung mit Fettsäuren steigender Kettenlänge führt zu einer Verlängerung der Wirkung, die ihr Maximum beim Önanthat mit einer mittleren Überlebenszeit von 21 Tagen und einer längsten Überlebenszeit von 47 Tagen nach einmaliger Injektion von 20 mg hat. Weitere Verlängerung der Fettsäure über das Caprylat zum Undecylat läßt die Wirkungsdauer wieder absinken.

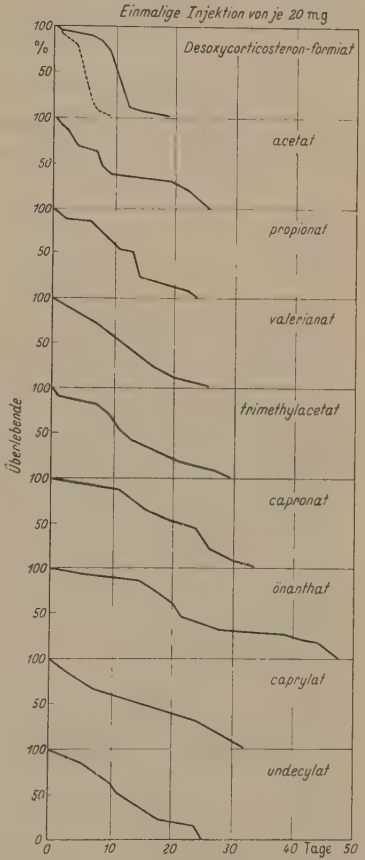


Abb. 1. Absterbekurve epinephrektomierter männlicher Goldhamster nach einmaliger Injektion verschiedener Desoxycorticosteron-21-ester

Zusammenfassung

Es wird über die Beeinflussung der Wirkungsdauer von Desoxycorticosteron hinsichtlich der Überlebenszeit epinephrektomierter Hamster durch Veresterung mit Fettsäuren verschiedener Kettenlängen in 21-Stellung berichtet. Als wirksamste Verbindung erwies sich das Desoxycorticosteron-21-önanthat.

Bei der Durchführung der Versuche erfreute ich mich der Mitarbeit von Fräulein MARGARETE ARNDT und Frau BRUNHILDE SUCHOWSKY.

Literatur

[1] JUNKMANN, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 85 (1952); **220**, 358 (1953); **223**, 244 (1954); **223**, 280 (1954). — [2] KÜCHMEISTER, H., u. G. ASSMANN: Acta endocrinol. (Copenh.) **18**, 379 (1955). — [3] KÜCHMEISTER, H., U. v. PENTZ u. G. ASSMANN: Z. exper. Med. **124**, 534 (1954).

Prof. Dr. KARL JUNKMANN, Hauptlaboratorium der Schering AG., Berlin N 65, Müllerstr. 170/2

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 214—220 (1955)

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz (Direktor: Prof. Dr. Dr. K. Lang)

Über einige Wirkungen von L-Glutaminsäure, D-Glutaminsäure und γ-Aminobuttersäure

Von
G. Czok und K. Lang

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. September 1955)

Frühere Untersuchungen hatten nach Gaben von Glutaminsäure eine Zunahme der Bewegungsaktivität (Zimmermann u. Mitarb., Albert u. Mitarb., Price u. Mitarb., Hamilton u. Maher) und der mit der Elektroschockmethode feststellbaren zentralen Erregbarkeit (Gerlich u. Remy) ergeben und somit zwei relativ einfache Verfahren zur Prüfung von Glutaminsäurewirkungen im Tierexperiment aufgezeigt. Unter Verwendung dieser Methoden wurde die Wirkung von L-Glutaminsäure mit der von D-Glutaminsäure verglichen und weiterhin geprüft, ob auch die γ-Aminobuttersäure, die im Gehirn durch Decarboxylierung der L-Glutaminsäure gebildet wird (Awapara, Wingo u. Awapara, Roberts und Frankel), zentralerregende Wirkungen aufweist, so daß möglicherweise die Glutaminsäurewirkungen auf diese Substanz bezogen werden müßten. Mit den optischen Antipoden der Glutaminsäure unternahmen wir außerdem Geschmacksuntersuchungen am Menschen, um festzustellen, ob der bekannte geschmacksverbessernde Effekt (Mosel und Kantrowitz, Rapaport, Crocker und Henderson) nur auf die L-Form beschränkt ist oder auch der D-Form zukommt.

Versuchsverfahren

1. Bestimmung der Bewegungsaktivität von Ratten. Männliche und weibliche Ratten mit einem Gewicht von 200—250 g wurden unter gleichmäßigen Bedingungen gehalten: Sie erhielten eine aus Milchpulver und Weizenschrot bestehende Kost, der kleine Mengen Lebertran beigegeben wurden, und Trinkwasser ad libitum. Die Messung ihrer Aktivität erfolgte mit Hilfe von Zitterkäfigen*, die an Spiralfedern aufgehängt waren und mit einem Arbeitssammler in Verbindung standen, auf den sich die Käfigschwingungen übertrugen. Der Arbeitssammler war an ein elektromagnetisches Zählwerk angeschlossen, so daß eine vom Standort des Zitterkäfigs unabhängige Aktivitätsregistrierung möglich war. Es wurden gleichzeitig 8 Zitterkäfige in Betrieb genommen. Sie waren in einem ruhig gelegenen, kleinen

* Eine ausführliche Beschreibung der benutzten Zitterkäfige soll an anderer Stelle erfolgen.

Raum aufgestellt, dessen Temperatur und Helligkeit konstant gehalten wurde. Die Tiere wurden an den Aufenthalt im Zitterkäfig und die erforderlichen Magensondierungen so gewöhnt, daß eine wesentliche Beeinflussung ihrer Aktivität hierdurch nicht erfolgte. Die Aktivitätsmessungen nach L-Glutaminsäure- und γ-Aminobuttersäurezufuhr gewannen wir an 32 bzw. 24 Ratten, die nach D-Glutaminsäure nur an 8 Ratten, da uns von dieser Substanz nur kleine Mengen zur Verfügung standen.

In einem ersten (Leer-)Versuch erhielten die Tiere Wasser, in weiteren Versuchen die verschiedenen Aminosäuren in verschiedenen Dosierungen peroral verabfolgt. Dies geschah immer zur gleichen Tageszeit; bei der gleichen Tiergruppe wurde zwischen 2 Versuchen jeweils ein Intervall von mindestens 3 Tagen eingelegt. Unmittelbar nach der Wasser- oder Aminosäurezufuhr kamen die Tiere in die Zitterkäfige. Die Registrierung der Aktivität wurde 30 min später begonnen und nach Ablauf von 3 Std beendet. Die Untersuchungsergebnisse wurden statistisch bearbeitet und nach dem „t-Test" von Fischer ausgewertet.

2. Bestimmung der zentralen Erregbarkeit bei Ratten. Sie erfolgte mit der von Gerlich angegebenen Elektroschockmethode. Gereizt wurde mit Wechselströmen verschiedener Spannung bei konstant bleibender Reizzeit (0,2 sec) und Reizfrequenz (5 pro Minute). Die vorgeschalteten Widerstände bezifferten sich auf 8000—9000 Ω. Nach Feststellung der Krampfspannung (= geringste Wechselstromspannung mit krampferregender Wirkung) beim unbehandelten Tier wurden die Aminosäuren verabreicht, und 30, 60, 90, 120 und 150 min danach die Krampfspannungen wiederum gemessen. Werden die einzelnen Meßwerte in Prozenten des Krampfspannungsausgangswertes ausgedrückt und als Ordinate gegen die Zeit als Abzisse aufgetragen, so ist das Verhalten der zentralen Erregbarkeit leicht festzustellen; ein Absinken der Kurve unter die Nullinie deutet auf eine Steigerung der zentralen Erregbarkeit, ein Ansteigen auf eine Abnahme derselben. Die Krampfspannungskurven auf den Abb. 1—3 sind aus jeweils 10 Einzelversuchen gewonnen. Als Maß der Streuung ist der mittlere Fehler des Mittelwertes (σ_M) für jeden Meßpunkt angegeben.

3. Toxicitätsbestimmungen an der Maus i.p. und peroral. Jede Substanz wurde an Gruppen von je 8 Mäusen in 5—6 Dosen getestet und die Absterberaten im Gaussschen Wahrscheinlichkeitsnetz eingetragen. Die Berechnung der DL 50 erfolgte nach dem von Litchfield und Wilcoxon angegebenen Verfahren.

4. Geschmacksprüfungen am Menschen. Insgesamt 10 männliche und weibliche Institutsmitglieder erhielten einmal reine Fleischbrühe (aus frischem Rindfleisch, mit NaCl leicht gewürzt), zum andern die gleiche Fleischbrühe unter Zusatz von Na-L-glutamat oder Na-D-glutamat. Es wurden die kleinsten Konzentrationen von Na-L- oder D-glutamat ermittelt, durch die sich eine deutlich wahrnehmbare Geschmacksverbesserung erzielen ließ. Die Versuchsergebnisse wurden nach dem Fischerschen t-Test statistisch ausgewertet.

5. Herstellung der Glutamatlösungen. Die schlecht lösliche L- und D-Glutaminsäure wurde in Wasser suspendiert, mit Natronlauge bei p_H 7,0 in Lösung gebracht und mit Wasser so verdünnt, daß eine 10 oder 20%ige Lösung entstand. Die Substanz liegt dann im wesentlichen als Mononatriumglutamat vor. L-Glutaminsäure stand uns ebenso wie γ-Aminobuttersäure als Fertigpräparat zur Verfügung. D-Glutaminsäure wurde bei uns nach der Methode von Hillmann und Elies präparativ dargestellt.

$[\alpha]_D^{25,5°}$ der L-Glutaminsäure in 9%iger Salzsäure = + 29,4°.

$[\alpha]_D^{23,5°}$ der D-Glutaminsäure in 9%iger Salzsäure = — 29,5°.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Aktivitätsversuche sind in der Tab. 1 zusammengestellt. Aus ihr ist zu entnehmen, daß Na-L-glutamat einen aktivitätsfördernden Einfluß besitzt. Die Wirkung erweist sich bereits nach Dosen von 2 mMolen/kg als eindeutig und läßt sich durch größere Dosen noch wesentlich erhöhen. Na-D-glutamat unterscheidet sich von der L-Form

Tabelle 1. *Einfluß von Na-L-glutamate, Na-D-glutamat und γ-Aminobuttersäure auf die Bewegungsaktivität von Ratten*

	Kontaktschlüsse pro 3 Std	%-Änderung	Signifikanzberechnung *t*-Test
Tiergruppe 1: (32 Ratten)			
Leerversuch	630 ± 59	—	—
2 mMole Na-L-glutamat pro Kilogramm K. Gew. per os	980 ± 111	+ 54,0	$P < 0{,}01 > 0{,}001$
4 mMole „	1000 ± 104	+ 58,6	$P < 0{,}01 > 0{,}001$
6 mMole „	1160 ± 107	+ 84,0	$P < 0{,}001$
Tiergruppe 2: (8 Ratten)			
Leerversuch	670 ± 98	—	—
2 mMole Na-D-glutamat pro Kilogramm K. Gew. per os	470 ± 57	— 29,8	$P < 0{,}05 > 0{,}01$
4 mMole „	490 ± 72	— 26,2	$P < 0{,}02 > 0{,}01$
6 mMole „	640 ± 108	— 3,9	$P < 0{,}02 > 0{,}01$
10 mMole „	590 ± 96	— 11,0	$P < 0{,}6 > 0{,}5$
Tiergruppe 3: (24 Ratten)			
Leerversuch	282 ± 43	—	—
1 mMol γ-Aminobuttersäure proKilogrammK.-Gew.per os	470 ± 68	— 66,7	$P < 0{,}05 > 0{,}02$
2 mMole „	700 ± 95	+ 148,2	$P < 0{,}001$
4 mMole „	995 ± 145	+ 252,4	$P < 0{,}001$

In Spalte 2 ist als Streuungsmaß der mittlere Fehler des Mittelwertes angegeben. $P < 0{,}01$ signifikant, $P < 0{,}001$ hochsignifikant.

dadurch, daß es eine aktivitätsfördernde Wirkung regelmäßig vermissen läßt. Auch bei 5mal höheren Dosen wurde die Motilität der Tiere nicht verändert. γ-Aminobuttersäure wirkt wie Na-L-glutamat, aber wesentlich stärker als dieses. Nach 2 mMolen/kg ist die Aktivitätssteigerung etwa 3mal und nach 6 mMolen/kg etwa 6mal so groß wie nach den entsprechenden Mengen von Na-L-glutamat.

Abb. 1—3 zeigen das Verhalten der zentralen Erregbarkeit nach peroralen Gaben der 3 Substanzen. Aus dem Verlauf der Krampfspannungskurven ist zu schließen, daß ihnen ohne Ausnahme eine zentralerregende Wirkung zukommt; verschieden sind allerdings die Dosen, bei denen diese Wirkungen in Erscheinung treten. Eindeutige Krampfspannungsänderungen ergeben sich nach 1 mMol Na-L-glutamat, 2½ mMolen γ-Aminobuttersäure und 3 mMolen Na-D-glutamat/kg. Ein

Abfall etwa gleich großen Ausmaßes wird durch 1 mMol Na-L-glutamat, 5 mMole Na-D-glutamat und 5 mMole γ-Aminobuttersäure ausgelöst. Na-L-glutamat wirkt somit etwa 4mal so stark wie Na-D-glutamat und 5mal so stark wie γ-Aminobuttersäure.

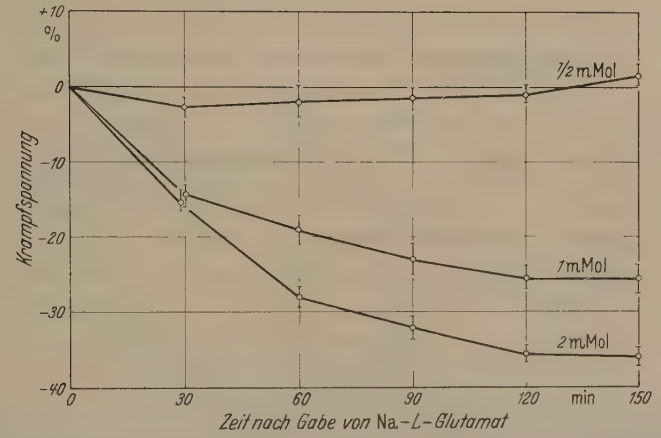


Abb. 1. Wirkung verschiedener Dosen von Na-L-glutamat ($\frac{1}{2}$, 1 und 2 mMole/kg K.-Gew. per os) auf die Krampfschwellen von Ratten. Die einzelnen Meßpunkte sind Mittelwerte aus 10 Versuchen. Für jeden Meßwert ist der mittlere Fehler des Mittelwertes als Maß der Streuung angegeben

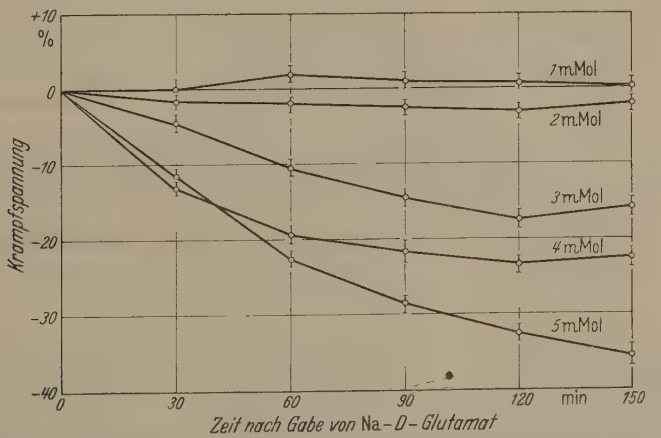


Abb. 2. Wirkung verschiedener Dosen von Na-D-glutamat (1, 2, 3, 4 und 5 mMole/kg K.-Gew. per os) auf die Krampfschwellen von Ratten. Die einzelnen Meßpunkte sind Mittelwerte aus 10 Versuchen. Für jeden Meßwert ist der mittlere Fehler des Mittelwertes als Maß der Streuung angegeben

Die Ergebnisse der Geschmacksprüfungen sind der Tab. 2 zu entnehmen. Man sieht, daß nicht nur Na-L-glutamat, sondern auch Na-D-glutamat den Geschmack von Speisen im günstigen Sinne zu beeinflussen vermag. Die Wirkung von Na-L-glutamat übertrifft allerdings die von Na-D-glutamat etwa um das 26fache.

Die geprüften Aminosäuren besitzen nur eine sehr geringe Toxicität (Tab. 3). Die perorale DL 50 liegt bei den 3 Aminosäuren um etwa 12 g/kg Die i.p. DL 50 von Na-L-glutamat liegt bei 3,75 g/kg, die von Na-D-

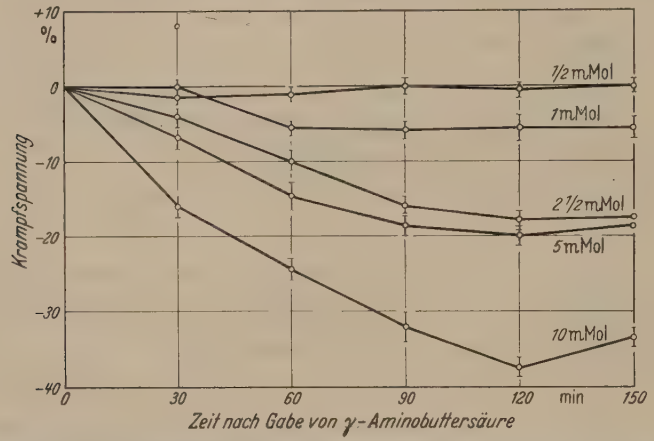


Abb. 3. Wirkung verschiedener Dosen von γ-Aminobuttersäure (½, 1, 2½, 5 und 10 mMole/kg K.-Gew. per os) auf die Krampfschwellen von Ratten. Die einzelnen Meßpunkte sind Mittelwerte aus 10 Versuchen. Für jeden Meßwert ist der mittlere Fehler des Mittelwertes als Maß der Streuung angegeben

Tabelle 2. *Geschmacksverbesserung von Fleischbrühe durch Zusatz von Na-L-glutamat und Na-D-glutamat*

Zahl der Versuche	Glutamat-Schwellenkonzentration mit geschmacksverbessernder Wirkung		Signifikanzberechnung
	L-Form	D-Form	*t*-Test
20	$3{,}9 \pm 1{,}11$ mg-%	$100{,}0 \pm 23{,}11$ mg-%	$P < 0{,}01 > 0{,}001$

Tabelle 3. *Toxicität von L-glutamat, D-glutamat und γ-Aminobuttersäure. Jede Substanz wurde in 5—6 Dosen an 40—48 Mäusen getestet*

	DL 50 (g/kg K.-Gew.)	
	i.p.	per os
Na-L-glutamat	3,8 (3,5—4,1)[1]	11,4 (10,5—12,4)
Na-D-glutamat	4,7 (4,1—5,3)	$\sim$ 12,0[2]
γ-Aminobuttersäure . .	5,2 (4,7—5,7)	12,7 (11,5—14,0)

[1] 5% Vertrauensgrenzen.
[2] Infolge Mangel an Substanz war die DL 50 nur näherungsweise zu bestimmen.

glutamat bei 4,70 g/kg und die von γ-Aminobuttersäure bei 5,2 g/kg. Die Zahlen stimmen für Na-L-glutamat mit den Werten von Klingmüller u. Vogelsang, für γ-Aminobuttersäure mit denen von Lang u. Oster gut überein.

Besprechung der Versuchsergebnisse

Unsere Ergebnisse, nach denen die typische Geschmackswirkung der Glutaminsäure als stereospezifischer Effekt imponiert und allein dem Na-L-glutamat in größerem Ausmaß zukommt, stehen in Übereinstimmung mit den Befunden von Menozzi, nach denen D-Glutaminsäure gleichfalls keinen wesentlichen Geschmackseffekt aufweist. Pasteur vermutete, daß die auf Geschmacksreize reagierenden nervösen Elemente eine optische Spezifität aufweisen.

Unseren Versuchen ist weiter zu entnehmen, daß zwischen Bewegungsaktivität und zentraler Erregbarkeit, die beide als Ausdruck bestimmter zentralnervöser Einwirkungen aufgefaßt werden können, grundlegende Unterschiede bestehen, da bei der Bewegungsaktivität die γ-Aminobuttersäure, bei der zentralen Erregbarkeit das Na-L-glutamat von entscheidender Bedeutung zu sein scheint. Na-D-glutamat hat auf die Aktivität keinen Effekt, auf die zentrale Erregbarkeit eine wesentlich geringere Wirkung als Na-L-glutamat. Man wird aus diesen Befunden schließen dürfen, daß die zentrale Erregbarkeit auf unveränderte Glutaminsäure und zwar ausgesprochen stereospezifisch anspricht, die Anregung der Aktivität hingegen eine Umwandlung von Glutaminsäure in γ-Aminobuttersäure voraussetzt, die offenbar nur mit der L-Form in meßbarem Umfange erfolgt. Diese Deutung steht auch im Einklang mit unseren Vorstellungen über die Stereospezifität der Glutaminsäuredehydrogenase (v. Euler, Adler, Günther u. Das, Weil-Malherbe[1]) und die geringe Aktivität der D-Aminosäuren oxydierenden Fermente im Gehirn.

Nimmt man mit Weil-Malherbe[2, 3, 4] an, daß der Glutamateffekt durch eine vermehrte Adrenalinausschüttung hervorgerufen wird, so würden unsere Versuchsergebnisse in der Weise zu deuten sein, daß Glutamat oder γ-Aminobuttersäure bestimmte zentralnervöse Impulse auslösen, durch die eine gesteigerte Abgabe von Adrenalin in der Nebenniere bewirkt wird.

Zusammenfassung

Es werden die Wirkungen von Na-L- und D-glutamat, sowie γ-Aminobuttersäure auf die Bewegungsaktivität und zentrale Erregbarkeit von Ratten geprüft und am Menschen vergleichende Untersuchungen über die Geschmackswirkung von Na-L- und D-glutamat angestellt. Hierbei ergibt sich:

1. Die Bewegungsaktivität wird durch Na-L-Glutamat und γ-Aminobuttersäure gesteigert.

2. Die zentrale Erregbarkeit wird durch die geprüften Aminosäuren in verschiedenem Ausmaß erhöht. Na-L-glutamat hat den stärksten Effekt und wirkt etwa 4mal so stark wie Na-D-glutamat und 5mal so stark wie γ-Aminobuttersäure.

3. Die geschmacksverbessernde Wirkung von Glutamat kann nicht nur mit der L-Form, sondern auch mit der D-Form allerdings in etwa 26facher Dosis erzielt werden.

Wir danken Herrn H. Lang für die Darstellung von D-Glutaminsäure, dem Chemiewerk Homburg AG für die Überlassung von L-Glutaminsäure und γ-Aminobuttersäure.

Literatur

Albert, K. E., Hoch and H. Waelsch: J. Nerv. Dis. **114**, 471 (1951). — Awapara, J.: Texas Rep. Biol. a. Med. **8**, 443 (1950). — Crocker, E. C., and L. F. Henderson: Am. Perf. Essent. Oil Rev. **27**, 156 (1932). — Euler, H. v., E. Adler, G. Günther u. N. B. Das: Hoppe-Seylers Z. **254**, 61 (1938). — Gerlich, N., u. R. Remy: Nervenarzt **11**, 429 (1952). — Gerlich, N.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 160 (1949). — Hamilton, H. C., and E. B. Maher: J. Comp. a. Physiol. Psychol. **40**, 463 (1947). — Hillmann, G., and A. Elies: Z. physiol. Chem. **283**, 31 (1948). — Klingmüller, V., u. K. H. Vogelsang: Hoppe-Seylers Z. **300**, 97 (1955). — Lang, K., u. H. Oster: Biochem. Z. **324**, 443 (1953). — Litchfield, J. T., and F. W. Wilcoxon: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **98**, 99 (1949). — Mosel, J. N., and G. Kantrowitz: Amer. J. Psychol. **65**, 573 (1952). — Price, J. C., H. Waelsch and F. J. Putnam: J. Amer. Med. Assoc. **122**, 1153 (1943). — Rapaport, A.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **146**. 378 (1952). — Roberts, E., and S. Frankel: J. of Biol. Chem. **187**, 55 (1950); **188**, 789 (1951). — Weil-Malherbe, H.: [1] Biochemic. J. **30**, 665 (1936); [2] Physiologie. Rev. **30**, 549 (1950); [3] Biochem. Soc. Symposia **8**, 16 (1951); [4] Lancet **1953**, 623. — Wingo, W. J., and J. Awapara: J. of Biol. Chem. **187**, 267 (1950). — Zimmermann, F. T., B. B. Burgemeister and F. J. Putnam: Psychomatic. Med. **9**, 175 (1947); Amer. J. Psychol. **104**, 593 (1948).

Prof. Dr. Dr. K. Lang, Mainz, Physiol.-chem. Institut d. Johannes-Gutenberg-Universität

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 221—223 (1955)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Zagreb
(Vorstand: Prof. Dr. I. Ivančević)

Über den Einfluß des Ferro-Ions auf 5-Oxytryptaminwirkungen

Von
S. Milković, Z. Supek und J. Taborsky

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. September 1955)

Im Laufe einer Dauerinfusion von Ferrosalzlösungen konnte man am Blutdruck narkotisierter Katzen und Kaninchen einen partiellen adrenolytischen Effekt des Ferro-Ions feststellen[6, 3]. Es ist bekannt, daß viele adrenolytische Substanzen auch einen mehr oder minder ausgeprägten Antagonismus gegen das neue vasoconstrictorische biogene Amin, das 5-Oxytryptamin (5 OT) zeigen[1]. Die biologische Bedeutung des 5 OT ist derzeit noch sehr mangelhaft bekannt. Da die Kenntnis von antagonistischen Wirkungen für die Aufklärung der Funktion und Wirkungsweise der biologischen Substanzen immer wertvoll ist, so haben wir uns die Frage gestellt, ob auch zwischen 5 OT und Ferro-Ion ein Antagonismus besteht.

Methodik

Für die Blutdruckuntersuchungen dienten Hunde und Kaninchen, die mit Chloralose (0,07 g/kg) bzw. Urethan (1,25 g/kg) narkotisiert wurden. Den Hunden gaben wir 1 Std vor der Narkose 100 mg Morphinchlorhydrat pro Tier. Die Ferrosalzlösung wurde als Dauerinfusion vermittels der Müllerschen Spritze[4] verabreicht.

Isolierte Kaninchenohren nach Krawkow u. Pissemski wurden mit der Lösung nach Page u. Green[5] bei Zimmertemperatur durchströmt. Die Tropfen wurden mit dem Tropfenzähler nach Fleisch registriert. Die Arterienkanüle konnte vermittels eines Dreiwegehahnes entweder mit der gewöhnlichen oder der das Ferro-Ion enthaltenden Durchströmungslösung verbunden werden.

Die Versuchsanordnung für Rattenuterus und -colon war die übliche, unter Verwendung der Lösung nach Gaddum u. Mitarb.[2]. Die Temperatur des 2,5 ml enthaltenden Bades war für den Uterus 30° C und für das Colon 26° C. Um die Empfindlichkeit des Uterus zu erhöhen, behandelten wir die Ratten zwei Tage vor dem Versuche mit 100 μg Stilboestrol pro Tier. Die Kontraktion des isolierten Organs wurde vor und nach einer Behandlung mit Ferrosalzlösung verglichen. Das Organ blieb in der Ferro-Ion-Lösung 10 min lang eingetaucht.

Zur Herstellung der Eisen-Lösung wurde Ferrosulfat pro analysi verwendet. Die Mengen von 5 OT sind immer auf die reine Base und nicht auf den 5 OT-Kreatininsulfatkomplex zu beziehen.

Resultate

Die Dauerinfusion von Ferro-Ionlösungen hebt deutlich sowohl die vasopressorischen als auch die vasodepressorischen Effekte des 5 OT an narkotisierten Tieren auf (Abb. 1 und 2). Die Hemmung ist nicht vollkommen, was auch bei Adrenalin der Fall ist.

Am isolierten Kaninchenohr ließ sich mit Ferro-Ion die durch 5 OT hervorgerufene Vasoconstriction fast völlig auslöschen. Von einem

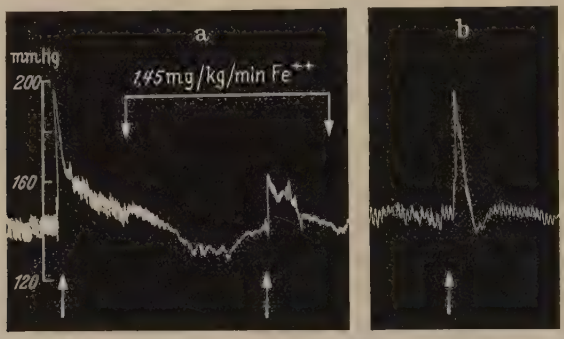


Abb. 1. Carotisblutdruck des Hundes (15 kg). Geschwindigkeit 6 mm/min. Beim Pfeil 300 μg 5-Oxytryptamin i. v. Zwischen a und b 30 min Pause

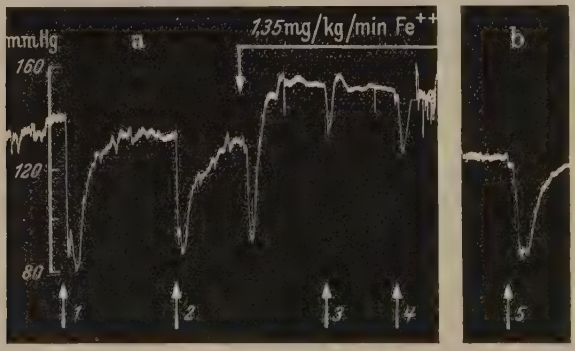


Abb. 2. Carotisblutdruck des Kaninchens (3 kg). Geschwindigkeit 6 mm/min. 1. 100 μg 5-Oxytryptamin i. v. 2. 50 μg 5-Oxytryptamin i. v. 3. wie 2. 4. wie 1. 5. wie 1. Zwischen a und b 20 min Pause

mächtigen vasoconstrictorischen Effekt ist nur eine geringfügige Tonuszunahme übriggeblieben. (Abb. 3).

Die Ferrosalzlösungen selbst haben an den beiden Testobjekten eine gefäßerweiternde Wirkung.

Selbst mit sehr hohen Konzentrationen von Ferro-Ion in der Badflüssigkeit (50 mg/l) konnten wir am Rattenuterus und -colon keinen Antagonismus zu 5 OT feststellen.

Besprechung

Unsere Resultate zeigen, daß ähnlich wie bei Adrenalin ein Antagonismus zwischen Ferro-Ion und 5 OT besteht. Die Reaktion zwischen den beiden letzteren spielt sich im Erfolgsorgan ab, wie unsere Untersuchungen am isolierten durchströmten Kaninchenohr beweisen konnten. Solche Reaktion kann man weder am Rattenuterus noch am Rattencolon auslösen. Es scheint daher, daß sich die adrenolytische Wirkung des Ferro-Ions auf die glatte Muskulatur der Gefäße begrenzt. Das ist auch der Fall beim Adrenalin. Ferro-Ion kann nicht die Wirkung des Adrenalins auf die glatte Muskulatur der Kardia verhindern[3].

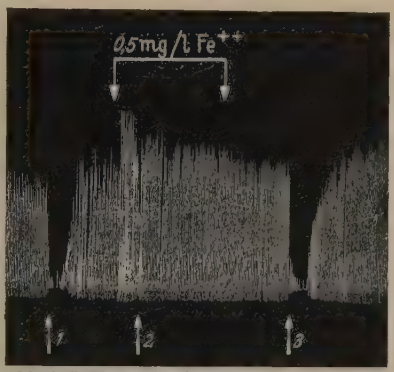


Abb. 3. Isoliertes durchströmtes Kaninchenohr. Geschwindigkeit 0,5 mm/min. 1., 2. u. 3. 0,005 µg 5-Oxytryptamin

Die sehr wichtige Frage der Spezifität und der Natur des beschriebenen Antagonismus haben wir vorläufig offen gelassen. Untersuchungen darüber sind noch im Gange.

Zusammenfassung

1. Die blutdruckerhöhenden und -senkenden Wirkungen des 5-Oxytryptamins an narkotisierten Hunden und Kaninchen werden durch die Dauerinfusion von Ferro-Salzen weitgehend abgeschwächt.

2. Das Ferro-Ion hebt fast vollkommen die nach 5-Oxytryptamin auftretende Vasoconstriction am isolierten, durchströmten Kaninchenohr auf.

3. Es besteht kein Antagonismus zwischen Ferro-Ion und 5-Oxytryptamin am isolierten Rattenuterus und -colon.

Das 5-Oxytryptamin-kreatininsulfat wurde uns freundlicherweise von den Firmen Farmitalia, Milano und Abbott Lab. North Chicago überlassen.

Literatur

[1] Gaddum, J. H., and K. A. Hameed: Brit. J. Pharmacol. 9, 240 (1954). — [2] Gaddum, J. H., W. S. Peart and M. Vogt: J. of Physiol. 108, 467 (1949). — [3] Ivančević, I., u. P. Stern: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 199, 153 (1942). — [4] Müller, E. A.: Arch. exper. Path u. Pharmakol. 194, 426 (1940). — [5] Page, I. H., and A. A. Green: Methods in Medical Research 1, 123 (1948); zit. nach [1]. — [6] Straub, W., u. K. Stefansson: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 194, 269 (1940).

Dr. S. Milković,
Pharmakologisches Institut der Universität Zagreb, Šalata, Jugoslawien

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 224—233 (1955)

Aus der pharmakologischen Abteilung der Medizinischen Forschungsanstalt der Max-Planck-Gesellschaft, Göttingen (Leiter: Prof. Dr. Dr. W. Koll)

Eigenschaften und Gewinnung von Darmstoffpräparaten

Von

Walther Vogt

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 21. September 1955)

Die Vielzahl glatte Muskulatur erregender Substanzen, die sich aus Darmgewebe extrahieren läßt, gab Anlaß, die chemischen Eigenschaften von Darmstoff näher zu untersuchen, um möglichst reine Präparate zu gewinnen und den Stoff weiter zu charakterisieren. Untersuchungen über zunächst vermutete Beziehungen zur Substanz P deckten bereits Besonderheiten des Darmstoffs auf, die zur Reinigung ausgenutzt werden konnten (W. Vogt, 1953b). Die zur Zeit erhaltenen Kenntnisse über Eigenschaften von Darmstoff, die in der vorliegenden Arbeit veröffentlicht werden, sprechen dafür, daß er zu beiden Hauptklassen biogener darmerregender Stoffe, den biogenen Aminen und den pharmakologisch aktiven Polypeptiden, nicht gehört.

Allgemeine Methodik

Bisher sind keine chemischen Reaktionen bekannt, die die Erkennung des Darmstoffs oder seine quantitative Bestimmung ermöglichten. Daher sind alle Erfahrungen über chemische und physikalische Eigenschaften durch pharmakologische Auswertung der entsprechend behandelten Extrakte oder erhaltenen Fraktionen gesammelt worden.

Zum biologischen Nachweis wurde das isolierte Duodenum oder Jejunum von Kaninchen in Tyrodelösung von 38° C benutzt. Als Maß für die Wirkungsstärke diente die nach Zusatz des Extraktes erreichte maximale Kontraktionshöhe. Sie wurde für quantitative Bestimmungen nach dem Vierpunkt-Testverfahren mit der Wirkung eines Standardpräparates, von dem 10 γ als eine Darmstoffeinheit (1 E-E) definiert wurden (W. Vogt, 1953a), verglichen. Anordnung und rechnerische Auswertung der Bestimmungen erfolgte nach der von W. Koll u. H. Kaller angegebenen Methode.

Vor der biologischen Auswertung waren die Extrakte von störenden Substanzen, die durch die chemische Aufarbeitung hineingekommen waren, zu befreien. Von etwa vorhandenen anorganischen Salzen wurde Darmstoff durch Ausschüttelung seiner wäßrigen Lösung mit Butanol bei saurem p_H abgetrennt. Organische Lösungsmittel wurden auf dem Wasserbad abgedampft oder, wenn es sich um größere Mengen handelte, im Vakuum abdestilliert. Das p_H wurde dabei so korrigiert, daß der Extrakt vor dem Eindampfen zunächst mit HCl schwach sauer eingestellt und dann mit NH_3 überneutralisiert wurde. Dadurch wurde eine

anfangs mäßig alkalische, sich beim Eindampfen rasch neutralisierende Reaktion erreicht und die Gefahr des Sauerwerdens vermieden. Gegenüber saurem p_H ist Darmstoff empfindlich, dagegen beständig bei alkalischer Reaktion.

Ergebnisse

Löslichkeit

In Wasser löst Darmstoff sich leicht, wenn etwas Alkali zugegen ist, dagegen schwer bei saurer Reaktion. Aliphatische Alkohole, die von C_1 bis C_5 untersucht wurden, sowie Aceton, Eisessig und Äther lösen gut. Auch in Benzol löst sich Darmstoff in gewissem Grade, wenn nicht bei alkalischer Reaktion eingedampft wurde. In Petroläther ist Darmstoff unlöslich. Bei Gegenwart von fett- und lipoidartigen Verunreinigungen wird er allerdings auch von diesem Lösungsmittel in Lösung gebracht.

Schwermetallionen wie Blei, Quecksilber oder Silber fällen Darmstoff aus wäßrigen Lösungen aus. Die Schwermetallverbindungen sind in Alkoholen löslich.

Verteilung in Zweiphasen-Flüssigkeitssystemen

Methodik. Die Verteilung von Darmstoff wurde durch einfaches Ausschütteln einer wäßrigen Lösung mit einem organischen Lösungsmittel oder durch Gegenstromverteilung studiert. Im ersten Fall wurde der Darmstoffgehalt der beiden Flüssigkeitsphasen miteinander verglichen, im zweiten der Ort des Maximums an darmerregender Wirkung in der Verteilungsreihe ermittelt. Die Gegenstromverteilungen wurden zum Teil in Scheidetrichtern, zum Teil in Apparaten nach N. Grubhofer oder F. Weygand durchgeführt. In den beschriebenen Versuchen erfolgte die Numerierung der Rohre einheitlich von o bis n bei $n$facher Verteilung ($= n + 1$ Rohre!), wobei Rohr o die extrem lipoidlöslichen, Rohr n die extrem wasserlöslichen Stoffe enthält.

Die Verteilung von Darmstoff zwischen Wasser und organischen Lösungsmitteln, wie Äther, Chloroform, Methyläthylketon oder Acetessigester ist stark vom p_H abhängig. Bei saurem p_H findet sich die darmerregende Wirkung überwiegend in der organischen Phase, bei alkalischer Reaktion in der Wasserschicht. Im System Methyläthylketon-Wasser liegt der Umkehrpunkt, d. h. Verteilung entsprechend einem Verteilungskoeffizienten $k = 1$, in der Gegend von p_H 6,25, nach dem Ergebnis einer 8fachen Gegenstromverteilung zu schließen, bei der das Wirkungsmaximum in Rohr 4 lag. Auch in dem Lösungsmittelpaar Butanol-Wasser macht sich der p_H-Einfluß geltend, allerdings nur soweit, daß sich Darmstoff bei alkalischer Reaktion des Systems etwa gleichmäßig auf beide Phasen verteilt und nicht bevorzugt auf die Wasserphase. Bei saurer Reaktion findet sich nahezu die gesamte Darmwirkung in der Butanolschicht ($k > 50$).

Ein für präparative Zwecke brauchbares Lösungsmittelsystem ergibt eine Mischung aus 21 vol n-Butanol, 42 vol Benzol, 35 vol Methanol und 35 vol mol/15 Natriumphosphatpuffer von p_H 5,58—5,60. In diesem

Gemisch hat Darmstoff einen Verteilungskoeffizienten von etwa 1. Verschiebung des p_H nach der sauren oder alkalischen Seite verändert auch hier die Verteilung zugunsten der vorwiegend organischen bzw. wäßrigen Phase (Abb. 1). Werden Kochextrakte von Warmblüterdärmen in diesem Lösungsmittelgemisch verteilt, so beobachtet man neben dem in der Mitte der Verteilungsreihe liegenden Wirkungsmaximum, das dem

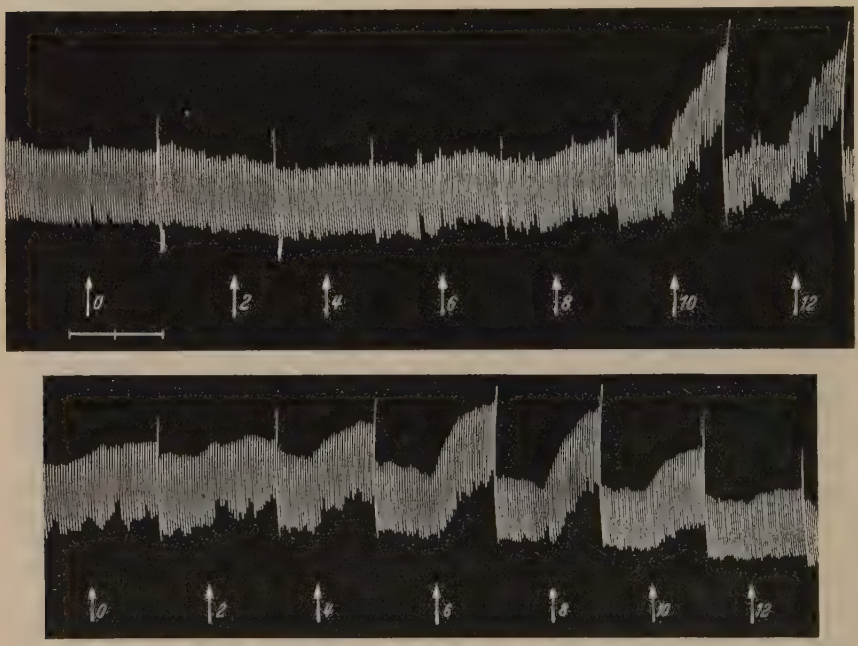


Abb. 1. 12fache Gegenstromverteilung von Darmstoff im System Benzol-Butanol-Methanol-Phosphatpuffer (42 + 21 + 35 + 35 Vol). Auswertung am Kaninchendarm (Auszug). — Oben: Verteilung bei einem p_H des Puffers von 6,55. Das Wirkungsmaximum liegt auf der „hydrophilen" Seite der Verteilungsreihe (in Rohr 11). — Darunter: Verteilung bei p_H 5,60. Das Wirkungsmaximum hat sich nach Rohr 7 verschoben, d. h. mit fallendem p_H wird Darmstoff relativ lipoidlöslicher. Zeit: 1 min

Darmstoff entspricht, ein weiteres in den ersten Rohren, d. h. auf der Seite der extrem lipoidlöslichen Stoffe. Es scheint sich hier um einen von Darmstoff verschiedenen, aber in mancher Hinsicht ähnlichen Stoff zu handeln, der bisher noch nicht näher untersucht wurde und als „Fraktion X" bezeichnet wird.

Beständigkeit, chemische Reaktionen

Temperatur- und p_H-Einflüsse. In alkoholischer und, wenn Bakterienwachstum verhindert wird, auch in neutraler wäßriger Lösung ist Darmstoff haltbar. In Ampullen eingeschmolzene wäßrige Lösungen zeigten innerhalb eines Jahres keine Wirkungsabnahme. 10 min langes Kochen

in n/10 HCl zerstört die Wirkung. Dagegen ist Darmstoff in neutraler oder alkalischer Lösung kochbeständig. Selbst kochende n/2 NaOH greift in 10 min nicht erkennbar an.

Dies steht in einem Widerspruch zu früheren Untersuchungen, nach denen auch Kochen bei alkalischer Reaktion zerstörend wirkte (W. Vogt, 1949). Möglicherweise sind an der Wirkung der für diese älteren Versuche benutzten Darmstoffpräparate andere, alkaliempfindliche darmerregende Substanzen beteiligt gewesen und haben so einen Wirkungsverlust der Extrakte bedingt.

Aus frischem Darmgewebe läßt sich durch Zerkochen mit n/5 NaOH sogar wesentlich mehr Darmstoff gewinnen als durch einfaches Auskochen mit Wasser.

Chemische Agenzien. Behandlung mit $NaNO_2$ in salzsaurer Lösung, ein Verfahren, das zur Abspaltung von NH_2-Gruppen führt, läßt die Wirksamkeit von Darmstoffpräparaten intakt.

1,6 mg eines Darmstoffpräparates mit 1490 E-E wurden in 1 cm³ n/5 $NaNO_2$ gelöst und mit 1 Tropfen n/1 HCl versetzt, nach einigen Stunden mit einem weiteren Tropfen. Das p_H betrug 3—4. Der deutlich nach nitrosen Gasen riechende Ansatz blieb 20 Std bei Zimmertemperatur stehen und wurde dann unter weiterem HCl-Zusatz im Exsiccator über P_2O_5 und NaOH zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde in 1 cm³ Wasser gelöst, mit 1 cm³ Butanol ausgeschüttelt und der Butanolextrakt mit einer Kontrolle biologisch verglichen, die in gleicher Weise, aber ohne $NaNO_2$ behandelt worden war. Beide Ansätze waren annähernd gleich stark, die Kontrolle vielleicht etwas stärker, aber deutlich weniger als doppelt so stark. Der geringe Wirkungsverlust war möglicherweise nur vorgetäuscht. Der Nitratansatz zeigte nämlich eine hemmende Wirkungskomponente, die nach der Ausschüttelung vorwiegend — aber vielleicht nicht vollständig — in die Wasserphase überging.

Kaliumpermanganat in saurer Lösung zerstört Darmstoff innerhalb von Sekunden. Auch Jod vernichtet die Darmstoffwirkung.

1,6 mg Darmstoff mit 1490 E-E wurden in 1 cm³ Wasser gelöst, 1 Tropfen n/1 HCl und danach 6 Tropfen 0,1% $KMnO_4$-Lösung zugefügt. Die ersten 4 Tropfen wurden augenblicklich entfärbt, der 5. und 6. nicht mehr. 1 min nach Zugabe des 1. $KMnO_4$-Tropfens wurde der Überschuß des Oxydationsmittels durch Einleiten von H_2S zerstört (H_2S greift Darmstoff nicht an). Der Ansatz wurde zur Trockne gebracht, der Rückstand in 1 cm³ Wasser gelöst, mit 1 cm³ Butanol ausgeschüttelt und die Wirkung der Butanolphase mit einer Kontrolle am Kaninchendarm verglichen. Eine Dosis des behandelten Extraktes, die 120 E-E entsprach, wirkte überhaupt nicht mehr, während 60 E-E der Kontrolle kräftig erregten. 240 E-E der mit $KMnO_4$ behandelten Probe zeigten eine gewisse Wirkung, die aber immer noch schwächer als war 60 E-E des Kontrollansatzes und überdies einen anderen Verlauf nahm.

Nach Einwirkung von diazotiertem p-Nitranilin wirkt Darmstoff unverändert.

Fermente. Weder kristallisiertes Trypsin (Armour u. Comp.) noch ein Handelspräparat von Merck, das vermutlich verschiedene Peptidasen enthält, noch kristallisiertes Chymotrypsin (Novo) greifen Darmstoff an (Abb. 2).

Einfluß von Blut und Gewebsextrakten. Inkubation von Darmstoff mit hämolysiertem, durch „Thrombostop" ungerinnbar gemachtem Kaninchenblut führt innerhalb von 100 min zu keinem Wirkungsverlust. Acetontrockenpulver aus Darm, Lunge und Leber von Kaninchen haben nach 5 Std Einwirkung bei 40° C auf eine Darmstofflösung in Tyrode (p_H 7,25) ebenfalls keinen biologisch erkennbaren Einfluß. Auch die Darmstoffwirkung von Kaninchendarmhomogenaten in Tyrode (38° C, Luftdurchperlung) scheint sich im Laufe von 10 Std nicht zu verändern.

Adsorption

Aluminiumoxyd. Basisches Aluminiumoxyd (Merck) hält Darmstoff aus wäßrigen Lösungen nicht fest, adsorbiert aber, wenn der Wirkstoff in trockenem Butanol oder Butanolgemischen mit Cyclohexan oder Benzol gelöst wurde. Mit wassergesättigtem Butanol oder 50% wäßrigem Aceton läßt er sich wieder eluieren. Mit HCl vorbehandeltes „anionisches" Aluminiumoxyd adsorbiert auch aus wäßriger Lösung. In diesem Falle eignet sich n/5 NaOH als Eluens.

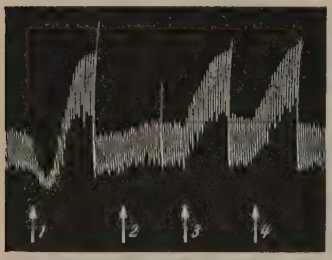


Abb. 2. Chymotrypsinwirkung gegenüber Bradykinin und Darmstoff. *1* Bradykinin-Kontrolllösung. *2* Bradykinin, 12 Std bei 38° C in Tyrode mit Chymotrypsin inkubiert. *3* Darmstoff-Kontrolllösung. *4* Darmstoff, wie Bradykinin mit Chymotrypsin behandelt. Bradykinin wurde zerstört, Darmstoff nicht

Ionenaustauschharze. Kationenaustauscher wie Wofatit C oder KS adsorbieren Darmstoff nicht. Dagegen hält der Anionenaustauscher Wofatit „M neu" Darmstoff fest. Die Bindung scheint aber nicht sehr stark zu sein, da nach längerem Durchwaschen mit Wasser beträchtliche Mengen von Darmstoff im Durchlauf erscheinen. N/5 NaOH löst den Wirkstoff vom Anionenaustauscher.

Papierionophorese

Methodik. Es wurde mit einem von Th. Wieland u. E. Fischer beschriebenen Apparat gearbeitet. Der Darmstoffextrakt wurde in einer quer über die Mitte eines 4 × 20 cm großen Papierstreifens (Sch. u. Sch. 2043b) laufenden Linie aufgetragen und anschließend die Pufferlösung aufgesprüht. Vor Versuchsbeginn wurde der Flüssigkeitsspiegel der beiden Elektrodengefäße auf gleiche Höhe gebracht, um eine Wasserströmung über das Papier hinweg zu verhindern. 110 oder 220 V Gleichstrom aus dem Netz wurden für 4—6 Std angelegt, sodann der Papierstreifen getrocknet, in einzelne Abschnitte zerlegt und deren Wirkstoffgehalt am isolierten Kaninchendarm bestimmt.

Bei p_H 6,65 (mol/15 Natriumphosphatpuffer) wanderte Darmstoff zur Anode. In einem Versuch bei p_H 2,88 (Glykokoll-NaCl-HCl-Puffer nach Sörensen) erfolgte keine Wanderung. Von der Vorstellung ausgehend, daß der Stoff auf Grund des sauren p_H auf der Papierfaser ausgefallen war, wurde ein weiterer Versuch auf propylenglykolgetränktem Papier

unternommen, in der Hoffnung, daß dadurch der Stoff gelöst bliebe. Aber auch diese, bei p_H 2,0 durchgeführte Ionophorese ließ keine Wanderung erkennen. Ein gleichzeitig zur Kontrolle auf das Papier gebrachter Pikrinsäurefleck wanderte 4 cm weit in Richtung auf die Anode.

Papierchromatographie

Methodik. Die Darmstoffextrakte wurden in Tropfen oder Streifen auf Sch. u. Sch. Papier 2043b aufgetragen und aufsteigend entwickelt, nachdem das Papier einige Stunden lang mit der in der Chromatographiekammer herrschenden Atmosphäre (Gasphase des Lösungsmittelgemisches) ins Gleichgewicht gebracht worden war. Die Lokalisation des Darmstoffes im Chromatogramm erfolgte durch biologische Auswertung einzelner Papierfraktionen. Wenn das Verhältnis von Blindwirkung etwa im Papier verbliebener Lösungsmittelreste zu Darmstoffwirkung es gestattete, wurden die Papierstückchen direkt in das Badegefäß des Testdarmes (Kaninchendarm) gesteckt, andernfalls wurden sie mit Methanol extrahiert, die Lösung eingedampft und der Rückstand nach Aufnahme in physiologischer Kochsalzlösung ausgewertet.

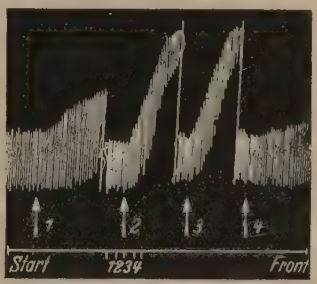


Abb. 3. Auswertung eines Papierchromatogramms von Darmstoff, mit Methyläthylketon-Diäthylamin-Wasser (60 + 3 + 20 Vol) entwickelt. — Darunter: Lage der ausgewerteten Zonen im Chromatogramm

Die für die Chromatographie von Aminosäuren bevorzugten Lösungsmittelgemische Butanol-Eisessig-Wasser oder Butanol-Ammoniak oder wassergesättigtes Butanol sind für Darmstoff wenig geeignet, da er in diesen Systemen mit der Lösungsmittelfront läuft. Immerhin wird er dadurch von Histamin, Cholin, Serotonin getrennt. Brauchbar war ein Gemisch von Methyl-Äthylketon, Wasser und Diäthylamin, das auch für präparative Reinigungszwecke benutzt wurde und ein Essigester-Pyridin-Wasser-Gemisch (Abb. 3). Die Tabelle gibt die R_f-Werte in einigen der versuchten Systeme wieder.

Tabelle 1

Lösungsmittelsystem[1]	Rf-Wert
Methyläthylketon-Diäthylamin-H_2O (60 + 3 + 20 Vol)	0,4—0,45
Chloroform-Methanol-Diäthylamin-H_2O (20+1+2+2Vol)	0,21
Benzol-Methanol-H_2O bei 33° C[2] (2 + 1 + 1 Vol)	0,0
n Butanol, wassergesättigt	um 0,9
Wasser	0,8—0,9
Xylol-Eisessig (10 + 1 Vol)	um 0,2 (tailing)
Benzol-Eisessig (20 + 1 Vol)	0,1
Essigester-Pyridin-H_2O (10 + 1 + 2 Vol)	0,39—0,47

[1] Soweit die Gemische zwei Phasen bilden, wurde die vorwiegend organische Phase benutzt.

[2] Von I. E. Bush (1952) für Steroide benutzt.

Allgemein zeigte Darmstoff in Alkoholen und Estern starke Wandertendenz, die durch Zufügen von Basen zum Gemisch etwas reduziert werden konnte. In aromatischen Kohlenwasserstoffen wanderte er kaum. Auch Zusatz von Essigsäure vergrößerte die R_f-Werte nicht erheblich.

Außer der biologischen Wirkung wurde bisher kein Merkmal bekannt, das Darmstoff im Chromatogramm erkennen ließe. Die Ninhydrinreaktion war immer negativ. UV-Adsorption war in der wirksamen Zone nicht vorhanden. Viele Extrakte zeigten in dem von Darmstoff besetzten Bereich eine starke gelbe Fluorescenz und eine rosa Farbreaktion mit Antimontrichlorid (R. Neher u. A. Wettstein). Beide Erscheinungen beruhten aber nicht auf Darmstoffeigenschaften, da Farbflecken und Zone biologischer Wirksamkeit sich nicht vollkommen deckten.

Darstellung und Reinigung von Darmstoffpräparaten

Als Ausgangsmaterial für größere Ansätze diente die sogenannte „Schleiße", feingeschabtes in Wasser suspendiertes Darmgewebe von Pferden und Rindern, das alle Schichten der Darmwand mit Ausnahme der Serosa enthält und bei der Wurstdarmgewinnung im Schlachthaus abfällt.

40 l Schleiße wurden 10 min gekocht, die Kochbrühe dekantiert und bei schwach saurem p_H mit dem halben Volumen Butanol ausgeschüttelt. Der Butanolextrakt wurde im Vakuum stark konzentriert und dann in zwei Partien einer 11fachen Gegenstromverteilung mit je Rohr 845 cm^3 oberer und unterer Phase des weiter oben angegebenen Gemisches aus Butanol, Benzol, Methanol und Phosphatpuffer p_H 5,6 unterworfen. Das Wirkungsmaximum lag beide Male in Rohr 6. (Ein zweites Maximum lag in Rohr 0 und entsprach der „Fraktion X".) Der Inhalt der Rohre 4 bis 8 wurde im Vakuum eingedampft, durch Ausschüttlung mit Butanol von Puffersalzen befreit, wieder eingedampft und wiederum im Gegenstrom verteilt, dieses Mal im System Methyläthylketon-Phosphatpuffer p_H 6,2, je Phase 120 cm^3. Die das Wirkungsmaximum einschließenden Rohrinhalte 2—5 wurden erneut zusammen eingedampft und von Salzen befreit[1]. Der Extrakt enthielt 2,44 Millionen E-E in 455 mg Trockensubstanz, das sind 5360 E-E/mg. 2,16 Millionen E-E wurden durch Chromatographie auf einer Papierpulversäule weiter gereinigt. In ein 2 cm weites, unten durch Glasfritte abgeschlossenes Rohr wurde Papierpulver (Schl. u. Sch.) 20 cm hoch mit einem Gemisch von Methyläthylketon, Wasser und Diäthylamin (28 + 1 + 1 Vol) eingeschlämmt. Der Extrakt wurde in wenig Methanol gelöst, auf etwas Papierpulver aufgezogen, die Masse getrocknet und auf die Papiersäule aufgedrückt. Sodann wurde mit dem angegebenen Lösungsmittelgemisch durchgewaschen und der Durchlauf in Fraktionen zu je 65 Tropfen mit einem Sammler aufgefangen. Von der 12. Fraktion an wirkten die durch-

[1] Bis zu dieser Stufe wurden die Extrakte nach eigenen Angaben freundlicherweise von Chemiewerk Homburg AG hergestellt.

gelaufenen Lösungen darmerregend, eine Zeitlang etwa in der gleichen Stärke. Von Fraktion 17 an ging die Aktivität zurück, und in Rohr 32 war kaum noch Wirkung nachweisbar. Die Fraktionen 12—34 wurden für die weitere Aufarbeitung gesammelt. Sie enthielten 1,87 Millionen E-E in 167 mg = 11200 E-E/mg. 1,78 Millionen E-E wurden nun auf 30 cm breiter Linie auf starkem Chromatographiekarton (Sch. u. Sch. 2230) aufgetragen und mit einem Methyläthylketon-Wasser-Diäthylamin-Gemisch (60 + 20 + 3 Vol) aufsteigend 18 cm hoch entwickelt. Trotz der Kartonstärke des Trägers war das Chromatogramm mit der angewandten Extraktmenge zweifellos überlastet worden und lieferte daher ein ziemlich breites Band, in dem sich die Hauptaktivität fand. Die Verteilung des Darmstoffes in dem Chromatogramm ist in dem Schema (Abb. 4) wiedergegeben.

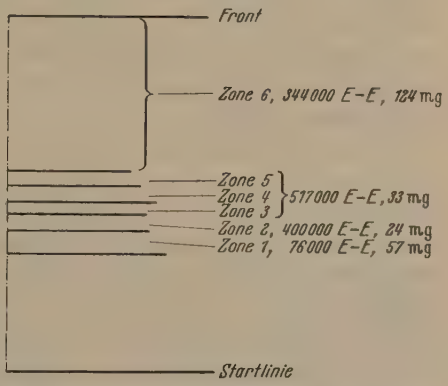


Abb. 4. Verteilung von Darmstoff im Chromatogramm auf Karton Sch. u. Sch. Nr. 2230. Verkleinerung 1:4. Einzelheiten im Text

Der aus den Zonen 2—5 extrahierte Wirkstoff — 917000 E-E in 57 mg Substanz = 16200 E-E/mg — wurde noch einmal mit dem gleichen Lösungsmittel chromatographiert, nun aber auf zwei Bogen von je 30 cm Breite des üblichen Papieres Sch. u. Sch. 2043b verteilt. Die darmerregende Wirkung fand sich in einem Streifen leuchtend gelber Fluorescenz und dicht darüber, R_f 0,4—0,45. Dieser Abschnitt wurde mit Methanol eluiert und ergab einen annähernd farblosen Extrakt mit 538000 E-E in 9,5 mg = 56700 E-E/mg.

Die papierchromatographische Reinigung war mit erheblichen Verlusten verbunden. Weitere Verluste wurden durch Ausscheiden von Randfraktionen, in denen das Verhältnis von Gewicht zu Wirksamkeit ungünstig schien, in Kauf genommen. Es resultierte aber dadurch ein Präparat, das noch in einer Verdünnung von 10^{-8} am isolierten Kaninchendarm wirkte und an Reinheit alle bis dahin hergestellten Extrakte übertraf.

Besprechung der Ergebnisse

Betrachtet man das chemische Verhalten von Darmstoff im Zusammenhang, so ergibt sich, daß es sich offenbar um eine Verbindung sauren Charakters handelt. Die Wanderung im elektrischen Feld zeigt dies direkt an, aber auch Löslichkeit und Verteilung in Zweiphasensystemen sprechen dafür. Gegenwart von Mineralsäuren drängt die

Dissoziation saurer Gruppen zurück und macht dadurch den Stoff schwer wasserlöslich. Alkalisierung fördert die Anionenbildung, daher ist Darmstoff bei alkalischer Reaktion leicht wasserlöslich. In organischen Flüssigkeiten gilt das gleiche, was aber in bezug auf die Löslichkeit den umgekehrten Effekt hat. Nicht dissoziierte organische Verbindungen sind in Lösungsmitteln eher löslich als Ionen. Folgerichtig fand sich Darmstoff nach Verteilung zwischen Wasser und Äther, Ester oder Ketonen bei alkalischer Reaktion vorwiegend in der wäßrigen, bei saurer Reaktion dagegen bevorzugt in der organischen Phase. Auch im System Butanol-Wasser macht sich der p_H-Einfluß in gleicher Richtung geltend, nur ist die relative Löslichkeit von Darmstoff in Butanol auch in der Alkalisalzform offenbar so groß, daß der Verteilungskoeffizient Butanol/Wasser nicht unter 1 sinkt.

Die Feststellung, daß Darmstoff eine Säure ist, überrascht deshalb, weil alle bisher im Darm gefundenen, ähnlich wirkenden Substanzen — wie die meisten Gewebshormone überhaupt — basischer Natur sind. Sie gehören zur Gruppe der biogenen Amine oder es sind, wie Substanz P, basische Peptide. Diese Eigenschaft des Darmstoffs gestattet deshalb, ihn von anderen Substanzen zu trennen. In einfachster Weise geschieht dies dadurch, daß man den fraglichen Extrakt bei saurem p_H zwischen Butanol und Wasser verteilt. Cholin, Histamin, Oxytryptamin, Substanz P befinden sich dann ganz oder vorwiegend in der Wasserphase, während Darmstoff in die Butanolschicht geht.

Zwei Substanzen allerdings teilen die Säurenatur mit Darmstoff: die ebenfalls darmerregende, in Darmextrakten nachgewiesene „Fraktion X" und das von U. S. von Euler beschriebene und später von S. Bergström näher untersuchte Prostaglandin aus Prostataextrakten. Fraktion X unterscheidet sich von Darmstoff durch die noch stärkere Lipoidlöslichkeit, die zur Auffindung dieser noch nicht näher untersuchten Substanz und ihrer Abtrennung in Gegenstromverteilungsreihen führte. Prostaglandin hat mit Darmstoff viele Eigenschaften gemeinsam. Es ist möglich, daß beide Stoffe verwandt oder sogar identisch sind, wenn auch nicht alle Eigenschaften, die beschrieben wurden, übereinstimmen. Bisher stand noch kein Prostaglandinpräparat zur Verfügung, so daß vergleichende Untersuchungen noch nicht möglich waren.

Es fragt sich, welcher Art die sauren Valenzen von Darmstoff sind. Phenolgruppen konnten nicht nachgewiesen werden, da die Behandlung mit Diazoreagentien die biologische Wirkung nicht änderte. Es liegt nahe, an Enol- oder Carboxylgruppen zu denken. Die für ein Enol erforderliche Doppelbindung könnte vorhanden sein, nach der Reaktion mit Permanganat und auch mit Jod zu urteilen.

Ob neben den sauren Gruppen auch basische vorhanden sind, bleibt noch ungewiß. Primäre Aminogruppen scheinen jedenfalls nicht vorhanden zu sein, da die Behandlung mit salpetriger Säure die Wirkung nicht zerstörte.

Summary

Darmstoff has the properties of an organic acid. It is soluble in alcohols, esters, ether and ketones. Its salts with alkali and earth-alkali are soluble in water. These properties indicate that Darmstoff is different from all biogenic gut stimulating substances, except Prostaglandin and another similarly acting substance called "Fraction X". Fraction X was found together with Darmstoff in extracts from intestine.

A method for preparing highly purified Darmstoff preparations is described.

Literatur

Bergström, S.: Nord. Med. **42**, 1465 (1949). — Bush, I. E.: Biochemic. J. **50**, 370 (1952). — Euler, U. S. von: Klin. Wschr. **1935**, 1182. — Grubhofer, N.: Chem. Ing. Techn. **22**, 209 (1950). — Koll, W., u. H. Kaller: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 133 (1952). — Neher, R., u. A. Wettstein: Helvet. chim. Acta **34**, 2278 (1951). — Vogt, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 1 (1949); **219**, 138 (1953a); **220**, 365 (1953b). — Weygand, F.: Chem. Ing. Techn. **22**, 213 (1950). — Wieland, Th., u. E. Fischer: Naturwissenschaften **35**, 29 (1948).

Dr. W. Vogt, Göttingen, Bunsenstr. 10,
Med. Forschungsanstalt d. Max-Planck-Gesellschaft,
z. Zt. c/o Professor Feldberg, National Institute for Medical Research,
The Ridgeway, Mill Hill, London NW 7

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 234—238 (1955)

Aus dem pharmakologischen Laboratorium der Chemischen Fabrik
Dr. F. Raschig G.m.b.H., Ludwigshafen/Rhein

Die analgetische Wirkung des 4-Methyl-2-Amino-Pyridins (W 45 Raschig)

Von
ELMAR VON HAXTHAUSEN

(Eingegangen am 15. Oktober 1955)

In einer früheren Abhandlung[1] wurde von uns über 4-Methyl-2-Amino-Pyridin (W 45 Raschig, Handelsname: „Ascensil") berichtet. Die einzelnen Wirkungen, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, reihen diese Verbindung in die Gruppe der Sympathomimetica ein. Verschiedene Autoren[2] haben eine analgetische Wirkung der Sympathomimetica aus der Adrenalin-Ephedrinreihe festgestellt, fanden jedoch übereinstimmend, daß der analgetische Effekt hinter der starken Kreislaufwirkung zurücktrat. Es lag deshalb nahe, zu prüfen, ob bei diesen Derivaten des Amino-Pyridins auch eine analgetische Wirkung vorhanden wäre.

Folgende Methoden wurden angewandt:

A. Wärmereiz des Ratten- und Mäuseschwanzes. Wir gebrauchten meist die von HAAS u. Mitarb.[3] modifizierte WOLFF-HARDY-Methode[4] mit dem ebenda beschriebenen Heizkörper.

B. Elektrischer Reiz des Rattenschwanzes. Diese Methode wurde ebenfalls von HAAS[3], KRAUSHAAR[5], LUCKNER u. MAGUN[6] beschrieben. Als Reizgerät benutzten wir ein handelsübliches Fabrikat („Myoton M 3"), das Rechteckstrom in variabler Stärke mit feststehendem Zeitabstand 60/min liefert. Ratten reagierten auf Ströme von 0,5—1,0 mA mit kurzem Schrei. Die Ergebnisse waren gut reproduzierbar, schwankten jedoch je nach Jahreszeit, so daß wir immer Kontrollen mit Morphin durchführen mußten.

C. Elektrischer Reiz des Kaninchens. Da Kaninchen auf Wärmereiz nur unsicher reagierten und die elektrische Reizung der Zahnpulpa (KOLL[7]) beim Kaninchen verschiedene prinzipielle Nachteile hat, wandten wir die elektrische Reizung beim ganzen Tier an. Die Tiere saßen auf einer mit Salzlösung angefeuchteten Zinkplatte, der indifferenten Elektrode. Die andere Elektrode wurde am enthaarten und angefeuchteten Ohr fixiert. Es war darauf zu achten, daß einmal ein guter Kontakt bestand, andererseits die Kaninchen durch die Elektrode nicht belästigt waren. Auf Induktionsströme von etwa 1,5 mA reagierten sie in typischer Weise mit Kopfschütteln und Unruhe.

Die Bewertung der analgetischen Wirkung erfolgte nach festliegendem Schema. Beim Wärmetest galt die Verlängerung der Reaktionszeit, bei der elektrischen Reizung die Erhöhung der Reizschwelle als Maßstab. 1 Punkt = Minimalwirkung (eben außerhalb des Streuungsbereiches), 4 Punkte = Maximalwirkung, z. B.

Morphin 2 mg je 100 g Ratte oder 0,5 mg je 100 g Maus. Als Grenzdosen bezeichneten wir die Menge, die bei 65% der Tiere noch Analgesie (= 1,5 Punkte) hervorrief. Es ergaben sich folgende Werte.

Tabelle 1

	Mäuse (Wärme) mg/100 g	Ratten (Wärme) mg/100 g	Ratten elektr.
Morphin	0,1—0,2	0,5	0,3
Dolantin*	2,0	2,0	1,5
Polamidon*	0,08—0,1	0,2—0,3	0,2

D. Prüfung der Reaktion auf periphere Reize an der Spinalratte. Ratten wurden unter Äthernarkose durch starke Ligatur Wirbelsäule und Spina in Höhe der ersten zwei Halswirbel zerstört. Nachfolgende künstliche Beatmung ließ in etwa 20 min den Äther abatmen, so daß die Tiere auf äußere Reize, z. B. Kneifen oder Wärmestrahlung, entsprechend reagierten. Zur Wärmestrahlung benutzten wir einen handelsüblichen 100 Watt-Widerstand, der auf 3—4 mm der Plantarseite der Pfote genähert wurde. Die Reaktion erfolgte in 2—4 sec.

E. Prüfung am Herz-Lungenpräparat der Ratte nach der von Stern u. Mitarb.[8] beschriebenen Methode, Modifikation von Haxthausen[9].

F. Einfluß auf peristaltischen Dehnungsreflex am isolierten Meerschweinchendarm und am ganzen Tier (Meerschweinchen und Hund) nach Straub[10].

G. Hustenerzeugung bei Katzen in flacher Pernocton-Narkose, indem wir die Trachealschleimhaut in Nähe der Stimmbänder mechanisch mit einer Schweineborste reizten.

Ergebnisse

Wir konnten die Befunde über die analgetische Wirkung der sympathomimetischen Amine aus der Adrenalin-Ephedrinreihe bestätigen. Bei elektrischer Reizung des Rattenschwanzes sahen wir eine leichte Analgesie, die sich auch durch hohe Dosen nicht verstärken ließ.

Geprüft wurden: Ephedrin, Veritol*, Effortil*. Keinerlei Analgesie rief Privin* hervor, obwohl es eine sehr starke Blutdrucksteigerung verursachte.

Demgegenüber sahen wir bei dem 4-Methyl-2-Amino-Pyridin (W 45 Raschig, Handelsname „Ascensil") eine beachtliche analgetische Wirkung.

Die Prüfung erfolgte im Laufe von 5 Monaten an über 300 Ratten und über 200 Mäusen. Wie schon oben erwähnt, sahen wir, je nach Witterung, erhebliche Schwankungen. Der ständig durchgeführte Vergleich mit Morphin ergab konstante relative Werte.

Die Grenzwerte betrugen:

Mäuse Wärmereiz	0,3 mg/100 g s.c.
Ratten Wärmereiz	0,8 mg/100 g s.c.
Ratten elektrischer Reiz . .	0,5 mg/100 g s.c.
Kaninchen elektrischer Reiz .	2 mg/kg s.c.

* Handelsbezeichnung: Name ges. gesch.

Danach verhält sich die analgetische Wirksamkeit des Morphins zu W 45 etwa wie 10:6,5.

Die bisher bekannten synthetischen Analgetica sind dem Morphin auch in bezug auf seine Nebenwirkungen weitgehend verwandt. Die depressive Wirkung auf Atmung, Herz und Kreislauf ist allen Verbindungen dieser Gruppe zu eigen. Dagegen konnten wir für W 45 eine Reihe von sympathomimetischen Wirkungen, wie Anregung der Atmung, der Herztätigkeit und Vasoconstriction nachweisen. Hier ist also Analgesie nicht gleichbedeutend mit Dämpfung der lebensnotwendigen Funktionen. Hinsichtlich der Atmungslähmung ist der Antagonismus Morphin—Amino-Pyridin schon von Shaw u. Bentley[11] beschrieben. Wir konnten die Befunde bestätigen und auf W 45 erweitern[1]. Weiterhin prüften wir am Herz-Lungenpräparat der Ratte den Antagonismus Morphin, Dolantin, Polamidon einerseits und W 45 andererseits. Regelmäßig konnte die Verschlechterung der Herzleistung, die durch Morphin, Dolantin und Polamidon hervorgerufen war, durch W 45 ganz oder teilweise behoben werden. Die angewandten Konzentrationen betrugen 1:500000 bis 1:1000000. Ebenso konnte an der Katze der durch die drei oben angeführten Analgetica hervorgerufene Kreislaufkollaps mit W 45 behoben werden. Es blieb noch die Frage, ob sich Morphin und W 45 bei der im übrigen gänzlich gegenteiligen Wirkung in analgetischer Hinsicht kombinieren lassen. Wir mischten deshalb beide Substanzen derart miteinander, daß einmal der Morphinanteil, zum anderen der W 45-Anteil überwog, und zwar im Verhältnis 1:8 bis 8:1 mit fließenden Übergängen. Ein Antagonismus der analgetischen Wirkung trat nicht auf. Vielmehr ergänzten sich Morphin und W 45 in ihrer analgetischen Wirkung additiv. In toxischer Hinsicht ging der Synergismus Morphin-W 45 über einen Additionseffekt hinaus, es wurde eine schwache Potenzierung beobachtet.

D. L. 50 für weiße Maus je 100 g:

W 45 = 10 mg Morphin = 40 mg	{Morphin = 20 mg + W 45 = + 3 mg}

N'allyl-Nor-Morphin (Nalorphine*) hebt die Wirkung des Morphins und der anderen synthetischen Analgetica auf. Wir prüften deshalb, ob auch die analgetische Wirkung des W 45 durch Nalorphine zu beseitigen war. Dies war tatsächlich der Fall. Zum Beispiel hob 0,3 mg/100 g Nalorphine die Wirkung von 1 mg/100 g W 45 weitgehend auf.

Eine Reflexhemmung an der Spinalratte, die durch Morphin eindeutig festzustellen war, konnten wir bei W 45 nicht nachweisen, da die

* Herrn Prof. Haas von der Chemischen Fabrik Knoll AG möchte ich hier noch einmal besonders danken für die Überlassung dieser Substanz.

Tiere schon bei 4—5 mg/100 g s. c. nach leichten Krämpfen eingingen. Diese Dosis liegt weit unter der LD 50 der Normalratte (s. c. etwa 16 mg/100 g Ratte). Wodurch diese starke Toxicitätssteigerung eintritt, wäre noch zu prüfen. Dosen von 3 mg/kg W 45 hemmten bei der Katze den Hustenreflex derart, daß er erst nach wiederholter Reizung der Trachealschleimhaut auftrat. Bei der vorausgegangenen Kontrolle war er stets auf einmalige Reizung hin aufgetreten. Morphin unterdrückte nach derselben Technik den Hustenreflex vollkommen.

Eine Hemmung der Peristaltik, wie sie bei Morphin festzustellen ist, konnten wir bei W 45 erst in wesentlich höheren Dosen nachweisen und dann dauerten sie auch nur wenige Minuten.

Diskussion

Die Feststellung einer starken analgetischen Wirkung bei dieser im übrigen sympathomimetisch wirkenden Verbindung W 45 bestätigt die Befunde von Kiessig u. Mitarb., Goetzel u. Mitarb u. a.[2], daß Analgesie eng mit dem sympathischen System verflochten ist. Im übrigen sind wir von der Deutung der analgetischen Wirkung noch weit entfernt. Man könnte annehmen, diese beiden im Grunde völlig verschiedenen Substanzen: Morphin und W 45 greifen an verschiedenen Systemen an und haben letztlich die gleiche Wirkung. Dafür spricht die Tatsache, daß die analgetische Wirkung des W 45 bei dystrophischen Ratten nahezu aufgehoben ist, nicht aber die des Morphins. (Werden die Ratten anschließend etwa 1 Woche gut mit eiweißreicher Kost gefüttert, so reagieren sie wieder normal.) In mancher Hinsicht kann man diesen dystrophischen Zustand einem Vagotonus gleichsetzen, der die sympathomimetische Wirkung reduziert. — Dagegen spricht die Tatsache, daß Nalorphine den analgetischen Effekt des W 45 mehr oder weniger stark aufhebt. Mit Rücksicht darauf, daß uns nur wenig Nalorphinsubstanz zur Verfügung stand, war es uns nicht möglich, den Antagonismus W 45-Nalorphine eingehend zu prüfen. Orientierende Versuche haben in bezug auf die Toxicität keinerlei Antagonismus ergeben. Dagegen spricht weiterhin, daß Pervitin die analgetische Wirkung des W 45 ebenso reduziert wie die des Morphins, des Polamidon und des Dolantin. Wir konnten die Befunde über einen Synergismus Morphin-Pervitin weder bei Ratten noch bei Mäusen bestätigen. Zur Anwendung kamen die oben angeführten Grenzdosen der betreffenden Substanzen und 0,05 bzw. 0,1 mg je 100 g Pervitin. Die von Schaumann[12] geäußerte Deutung mag bei den morphinähnlichen Analgeticis zutreffen, auf das W 45 sind die Verhältnisse nicht übertragbar.

Die klinische Untersuchung wird ergeben, ob die im Tierexperiment gefundenen Werte sich auf den Menschen übertragen lassen.

Zusammenfassung

Es wird über die analgetische Wirkung des 4-Methyl-2-Amino-Pyridins (W 45 Raschig, Handelsname: „Ascensil") berichtet. Bei gleicher Dosis entspricht W 45 etwa 60—70% der Morphinwirkung, ohne deren Nachteile. Die Prüfungen wurden ausgeführt an Mäusen, Ratten und Kaninchen nach verschiedenen Methoden.

In weiteren Versuchen hatte es sich herausgestellt, daß die analgetische Wirkung des W 45 sehr stark von den äußeren Umständen der Tierwartung abhängig war. Bei völlig gleicher Kost reagierten Ratten und Mäuse, die unter günstigen klimatischen Bedingungen standen (Raumtemperatur 20°, heller Raum, normale Luftfeuchtigkeit), eindeutig besser als andere, bei denen diese günstigen Bedingungen nicht gegeben waren. Diese Unterschiede konnten beim Morphin und verwandten Verbindungen nicht in dem Maße beobachtet werden.

Literatur

[1] Haxthausen, E. von: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 163 (1955). — [2] Zit. nach Suter, C. M.: Medical Chemistry. Vol. 1, Cap. 5. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1951. — [3] Haas, H., u. Mitarb.: Arzneimittelforschung **3**, 238 (1953). — [4] Wolff H. G., J. D. Hardy and J. Goodell: J. Clin. Invest. **19**, 649, 659 (1940). — [5] Kraushaar, A.: Arzneimittel-Forsch. **3**, 247 (1953). — [6] Luckner, H., u. R. Magun: Z. exper. Med. **117**, 133 (1951). — [7] Koll, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 83 (1952). — [8] Begovic, S., u. P. Stern: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 333 (1953). — [9] Haxthausen, E. von: Arzneimittel-Forsch. **5**, 370 (1955). — [10] Straub, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **169**, 1 (1933). — [11] Shaw, F. H., u. G. Bentley: zit. nach Ber. Physiol. **157**, 77 (1953). — [12] Schaumann, Q.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 48 (1951).

Dr. E. Frhr. von Haxthausen in Chem. Fabrik Dr. F. Raschig GmbH, Ludwigshafen/Rhein

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 239—245 (1955)

Aus der Biophysikalischen Abteilung des Heiligenberg-Institutes,
Heiligenberg/Baden (Direktor: Prof. Dr. H. Langendorff)

Zur Genese des durch Thioharnstoff und seine Derivate ausgelösten Lungenödems (Pneumonose)*

Von

R. Koch

(Eingegangen am 17. Oktober 1955)

Vor kurzem beschrieben wir die antagonistische Wirkung einer Reihe von SH-Körpern vom Typ des Cysteins, Homocysteins und Cysteamins gegenüber der Vergiftung mit α-Naphthylthioharnstoff (Koch u. Schwarze). Schon seit längerer Zeit ist bekannt, daß Thioharnstoff und seine Derivate in akut-toxischen Dosen schwere Lungenveränderungen hervorruft: Ödem, entzündliche Infiltration des Interstitiums mit Peribronchitis, teils auch Bronchitis und ausgedehntem Pleuraerguß (Richter u. Clisby; MacKenzie u. MacKenzie; Griesbach. Kennedy u. Purves; Meyer, Collins u. Marine; Richter; Dieke u. Richter; Marine u. Baumann; Langendorff, Koch u. Hagen). Über die Genese dieser Lungenveränderungen ist bisher nichts sicheres bekannt. Es entsteht gleichzeitig die Frage, ob sich der oben beschriebene antagonistische Effekt bestimmter Sulfhydrylkörper auch auf diesen Teil der toxischen Thioharnstoffwirkung erstreckt.

Im toxikologischen Schrifttum werden entsprechende Lungenveränderungen gemeinhin zusammenfassend als toxisches Lungenödem bezeichnet. Damit sind unseres Erachtens die Veränderungen nicht genügend charakterisiert. Mindestens ebenso eindrucksvoll wie das Ödem sind die entzündlichen Prozesse im Interstitium. Brauer hat für solche Vorgänge den treffenden Ausdruck Pneumonose geprägt. Genau wie das Lungenödem kann die Pneumonose durch sehr verschiedene Noxen ausgelöst werden:

Es geschieht sowohl durch Schädigungen, die per inhalationem die Lunge erreichen, als auch durch Kreislaufumstellung oder anderweitig bedingte Veränderungen der Capillarpermeabilität. Es hat sich gezeigt, daß sehr verschiedene das sympathische System erregende Vorgänge zum Bild der Pneumonose (Lungenödem) führen können. Als erster haben Jarisch, Richter und Thoma auf diese Möglichkeit aufmerksam gemacht und die Erregung rhombencephalischer Gebiete zur Erklärung herangezogen. Ausführlich ist dann später von Riechert u. Horst (Riechert; Riechert u. Barghorn; Horst; Horst, Legler u. Wegener) experimentell nachgewiesen worden, daß sich alle durch verschiedenste Pharmaka

* Herrn Prof. Dr. W. Schoeller zum 75. Geburtstag gewidmet.

und Noxen ausgelösten Sympathicuserregungen, die zu den Lungenveränderungen führen, durch Sympathicomimetica unterdrücken lassen. So wird das Lungenödem (Pneumonose) nach Cardiazol, Veratrin und Pikrotoxin genau so durch Gynergen unterdrückt wie dasjenige nach Vagotomie. Auch vom Adrenalin selbst ist gleiches bekannt. Zu den von Jarisch entwickelten Vorstellungen paßt auch, daß nach Luisada durch Chloralhydrat, Morphium, Luminal oder Paraldehyd, sowie durch Verletzung der Vierhügelgegend oder Halsmarkdurchschneidung das Adrenalin-Lungenödem gehemmt, durch zentrale Erregungsmittel wie Coffein oder Cardiazol dagegen gefördert wird. In diesem Zusammenhang ist auch auf die Beobachtung von Glass aufmerksam zu machen, daß nach Druckerhöhung in cerebralen Gefäßgebieten eine Pneumonose zu erzeugen ist.

In neuester Zeit ist von Cassen u. Kistler für das sich nach plötzlicher Überdruckbelastung („blast injury") entwickelnde Lungenödem eine zentrale Sympathicuserregung angenommen und experimentell belegt worden. Auch nach Untersuchungen französischer Autoren (Grandpierre u. Grognot; Grognot u. Chomé) über die Lungenveränderungen durch reine Sauerstoff-Inhalation scheinen sehr enge Beziehungen zum sympathischen System zu bestehen. Sowohl durch das Sympathicolyticum Megaphen (Chlorpromazine) als auch durch den Ganglienblocker Tetraäthylammoniumbromid lassen sich dieselben verhindern.

Wenn wir bei der akuten Intoxikation mit Thioharnstoff und seinen Derivaten Phenyl- und α-Naphthylthioharnstoff entsprechende Bilder einer Pneumonose erhalten, so wird es naheliegend sein ganz besonders auf den Einfluß des vegetativen Systems zu achten.

Experimenteller Teil

In den vorliegenden Versuchen verwendeten wir Ratten beiderlei Geschlechtes im Gewicht zwischen 115—220 g. Die Tiere erhielten „Latz-Rattenkeks" und Wasser ad libitum. Aus Vorversuchen war uns bekannt, daß eine einmalige intraperitoneale Gabe von 75 mg Thioharnstoff einen großen Teil der Tiere innerhalb

Tabelle 1

Nr.	Vorbehandlung	Thioharnstoffgabe
1	keine, Kontrolle	keine, Kontrolle
2	keine	75 mg Thioharnstoff (7,5%ige Lösung)/Tier i. p.
3	doppelseitige Adrenalektomie anschl. im Trinkwasser 1% NaCl	3 Tage nach der Adrenalektomie 75 mg Thioharnstoff/Tier i. p.
4	1 mg Hydergin/Tier s. c.	30 min nach der Hydergingabe 75 mg Thioharnstoff/Tier i. p.
5	2 mg Megaphen/100 g Tier i. p.	90 min nach der Megaphengabe
5a	2 mg Megaphen/100 g Tier s. c.	75 mg Thioharnstoff/Tier i. p.
6	2,5 mg Atropin/Tier s. c.	90 min nach der Atropingabe 75 mg Thioharnstoff/Tier i. p.
7	15 mg Cysteamin/Tier i. p.	15 min nach der Cysteamingabe 75 mg Thioharnstoff/Tier i. p.
8	4 Tage täglich 4 mg d,l-Thyroxin/Tier s. c.	am 5. Tag 75 mg Thioharnstoff/Tier i. p.

48 Std sterben läßt. Dabei findet sich das Bild der Pneumonose und ausgeprägter Pleuraergüsse. Die Ratten sind stark benommen und zeigen Schnappatmung.

In den Versuchen wird die Zahl der überlebenden Tiere nach 48 Std registriert, ferner das Lungengewicht in Gramm/100 g Körpergewicht und die Größe des Ergusses der innerhalb 48 Std gestorbenen und der danach mit Chloroform abgetöteten Tiere. Als Kontrollen dienen normale, unbehandelte und nur mit Thioharnstoff vergiftete Ratten. Die Untersuchungen umfassen adrenalektomierte Tiere, sowie solche, die mit Hydergin, Megaphen, Atropin, Cysteamin und Thyroxin vorbehandelt werden, ehe sie die toxische Thioharnstoffgabe erhalten. In Tab. 1 wird eine Übersicht über Dosierung und Applikationsart gegeben.

Die Dosierung des Hydergin, Megaphen und Atropin wählten wir nach früheren Versuchen (Küchler u. Koch).

Tabelle 2

Nr.	Behandlung	Mittleres Lungengewicht in g/100 g Tier				Mittlere Exsudatmenge in cm^3 bei den in 48 Std gestorbenen Tieren
		in 48 Std gestorbene Tiere	Zahl	nach 48 Std überlebende Tiere	Zahl	
1	keine, Kontrolle	—	0	0,86 ± 0,024	68	—
2	Thioharnstoff	1,89 ± 0,143	15	1,35 ± 0,063	5	3,06 ± 0,54
3	Adrenalektomie + Thioharnstoff	1,51 ± 0,100	28	—	0	4,27 ± 0,37
4	Hydergin + Thioharnstoff	1,34 ± 0,093	11	1,41 ± 0,163	9	3,24 ± 0,32
5	Megaphen i. p. + Thioharnstoff	1,13 ± 0,046	16	0,86 ± 0,026	9	3,12 ± 0,15
5a	Megaphen s. c. + Thioharnstoff	1,08 ± 0,055	20	—	0	2,40 ± 0,16
6	Atropin + Thioharnstoff	1,52 ± 0,100	9	1,05 + 0,084	12	2,55 ± 0,45
7	Cysteamin + Thioharnstoff	1,47 ± 0,130	7	1,12 ± 0,087	13	2,93 ± 0,46
8	Thyroxin + Thioharnstoff	1,33 ± 0,109	7	0,97 ± 0,035	13	2,43 ± 0,37

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tab. 2 zusammengestellt.

1. Kontrollen. Das von uns gefundene mittlere Lungengewicht unbehandelter Kontrolltiere entspricht den allgemeinen Angaben der Literatur.

2. Thioharnstoff. Nach der Thioharnstoffgabe sterben von 20 Tieren 15, wie es nach den Vorversuchen zu erwarten war. Das Lungengewicht steigt sowohl bei den überlebenden als auch gestorbenen Tieren signifikant an ($P = < 0{,}001$). Im Pleuraraum findet sich eine mittlere Exsudatmenge von 3,06 cm^3. Sowohl in diesen als auch allen folgenden Versuchen ist bei den nach 48 Std überlebenden Ratten niemals ein

Pleuraerguß zu finden. Derselbe ist also ein charakteristisches Zeichen der tödlichen Vergiftung.

3. Adrenalektomie. Nach der Adrenalektomie werden die Tiere gegenüber Thioharnstoff deutlich empfindlicher. Nach der $\varkappa^2$-Methode ergibt sich ein Unterschied der beiden Absterbequoten Thioharnstoff: Adrenalektomie plus Thioharnstoff mit $P_{2-3} = 0{,}02$. Das mittlere Lungengewicht der gestorbenen Tiere ist dagegen signifikant niedriger ($P = 0{,}05$—$0{,}02$), während die Exsudatmenge nicht mit Sicherheit zunimmt ($P = 0{,}1$ bis $0{,}05$).

4. Hydergin. Es gelingt nicht durch Vorbehandlung mit Hydergin die Überlebensquote zu verbessern: $P_{2-4} = 0{,}3$. Das mittlere Lungengewicht der gestorbenen Tiere liegt zwar tiefer ($P = 0{,}01$—$0{,}001$), das der überlebenden ist jedoch praktisch unverändert gegenüber den Thioharnstoff-Kontrollen ($P = 0{,}7$), dagegen stark erhöht im Vergleich zu Normaltieren ($P = 0{,}001$). Die Exsudatmenge entspricht der bei alleiniger Thioharnstoffgabe ($P = 0{,}8$—$0{,}7$).

5. u. 5a. Megaphen. Megaphen wird als starkes Sympathicolyticum verwendet. Betrachten wir zunächst Versuch 5a, bei dem 2 mg Megaphen/100 g Ratte subcutan gegeben werden. Es handelt sich um eine übliche und gut wirksame Rattendosis. Durch die nachfolgende Thioharnstoffapplikation werden alle Tiere getötet. Bei diesem Effekt besteht kein statistisch zu sichernder Unterschied zu den Thioharnstoff-Kontrollen: $P_{2-5a} = 0{,}1$—$0{,}05$. Auffallend ist die starke Reduktion des Lungengewichtes ($P = < 0{,}001$). Der Pleuraerguß ist jedoch unverändert ($P = 0{,}3$—$0{,}2$).

Durch ein Versehen wurde in der Gruppe 5 die gleiche Dosis Megaphen intraperitoneal appliziert. Sie entsprach nach den Angaben von Courvoisier, Fournel, Ducrot, Kolsky u. Koetschet annähernd der DL 50. Überraschenderweise überlebten mehr Tiere als im vorhergehenden Versuch. Da $P_{2\ 5} = 0{,}7$—$0{,}5$ betrug, ließ sich ein Unterschied zu den Thioharnstoff-Kontrollen nicht feststellen. Auffallend war das niedrige Lungengewicht der überlebenden Tiere, das dem der unbehandelten Ratten entsprach. Dasselbe fand sich auch bei den gestorbenen Tieren, so daß der P-Wert zu den allein mit Thioharnstoff behandelten Ratten beide Male $P = < 0{,}001$ ergab.

6. Atropin. Die mit Atropin behandelten Tiere verhielten sich im Prinzip wie die Thioharnstoff-Kontrollen ($P_{2-6} = 0{,}1$—$0{,}05$). Lediglich in den Lungengewichten trat eine mäßige Senkung ein ($P_{\text{gestorb. T.}} = 0{,}05$ bis $0{,}02$; $P_{\text{überleb. T.}} = 0{,}02$—$0{,}01$). Auch der Pleuraerguß war der gleiche wie bei den Kontrollen ($P = 0{,}5$—$0{,}4$).

7. Cysteamin. Nach Cysteamin stieg erstmalig die Überlebensquote an: $P_{2-7} = 0{,}05$—$0{,}02$. Die Abnahme des Lungengewichtes war sowohl

bei den gestorbenen als auch überlebenden Tieren signifikant ($P = 0{,}05$ bis 0,02). Dagegen zeigten die gestorbenen Ratten dieselbe Ergußmenge ($P = 0{,}9$—0,8).

8. Thyroxin. Denselben Effekt beobachteten wir an mit Thyroxin vorbehandelten Tieren. Auch hier stieg die Überlebensquote signifikant an: $P_{2-8} = 0{,}05$—0,02 und nahm das Lungengewicht beider Gruppen ab ($P = 0{,}01$—0,001 und $< 0{,}001$), während der Erguß unverändert war ($P = 0{,}4$—0,3).

Diskussion

Aus den vorliegenden Befunden an adrenalektomierten, sowie mit Hydergin bzw. Megaphen vorbehandelten Tieren geht hervor, daß der Mechanismus der durch Thioharnstoff ausgelösten Lungenveränderungen ein anderer sein muß als der einer einfachen Übererregung des sympathischen Systems. Es bestehen trotz gleicher oder sehr ähnlicher pathologisch-anatomischer Befunde wesentliche pathogenetische Unterschiede zu den Vorgängen nach Adrenalin, Cardiazol, Veratrin, Vagotomie, „blast-injury" oder Sauerstoffintoxikation. Unsere Beobachtungen decken sich hier mit denen von Friedenwald u. Buschke, sowie May, Moseley u. Forbes, die nach Thioharnstoff sogar eine Hemmung adrenergischer Effekte beobachten. Inwieweit für einzelne Vorgänge komplexbildende Eigenschaften des Thioharnstoff, besonders zu Kupfer verantwortlich zu machen sind, ist zur Zeit nicht zu entscheiden.

Glock ergänzt die eigenen und zitierten Befunde, indem sie bei Ratten eine schwere Schädigung der Nebennieren feststellt, wenn die Tiere bis zu 120 Tagen Thioharnstoff erhalten. — Es soll aber nicht übersehen werden, daß die nach Thioharnstoff zu beobachtende Hyperglycämie (DuBois, Holm u. Doyle; DuBois, Herrmann u. Erway) sicher ein sympathicotoner Effekt ist, da er durch Insulin, Ergotamin und Nebennierenmark-Entfernung aufgehoben wird.

Schon de Ritis u. Scalfi haben an Bakterien auf eine antagonistische Wirkung von Cystein, Glutathion und Thioglykolsäure gegenüber Thioharnstoff aufmerksam gemacht. Später beschreiben DuBois, Holm u. Doyle einen gleichen Effekt des Cysteins gegenüber der α-Naphthylthioharnstoff-Vergiftung. Wir haben diese Beobachtung bestätigt und dahingehend ergänzt, daß es sich hierbei sehr wahrscheinlich um einen spezifischen Effekt bestimmter Sulfhydrylkörper vom Typ Cystein-Cysteamin handelt (Koch u. Schwarze). Nun zeigt auch in den vorliegenden Untersuchungen mit Thioharnstoff Cysteamin denselben antagonistischen Effekt, der in der Überlebensrate eindeutig, bei den Lungenveränderungen weniger ausgeprägt ist. Eine Erklärung für die Cysteaminwirkung können wir nicht geben. Da auch nach Megaphen die Lungenveränderungen quantitativ zurückgehen, ohne daß sich die Überlebensquote ändert, muß daran gedacht werden, daß der Tod nach

toxischen Thioharnstoffgaben sowohl eine pulmonale als auch zentrale Ursache haben kann.

Die thyreostatische Wirkung des Thioharnstoffes und seiner Derivate ist hinreichend bekannt. Es erhebt sich die Frage, ob dieselbe mit unserer Problemstellung in Zusammenhang steht. Von MacKenzie u. MacKenzie ist das abgelehnt worden. Genauso sprechen die Befunde von Fitzhugh u. Nelson dagegen, die bei chronischer Thioharnstoff-Intoxikation zwar schwerste Schilddrüsen-, jedoch keine Lungenveränderungen sehen.

Da uns die Befunde von Marine u. Baumann bekannt waren, wonach es nach Thyreoidektomie und Adrenalektomie zu einer Verbesserung der Lebenserwartung nach Thioharnstoff-Vergiftung kam, untersuchten wir dieses für den Fall der Nebennierenentfernung nach. Es zeigte sich jedoch, daß die Tiere eher empfindlicher wurden, ein Schutzeffekt war jedenfalls nicht zu konstatieren. Die Befunde von Marine u. Baumann standen gleichzeitig im Widerspruch zu denen von MacKenzie u. MacKenzie, sowie Griesbach, Kennedy u. Purves bezüglich des Einflusses der Thyreoidea. Gleichsinnig verliefen unsere Untersuchungen, bei denen die Tiere 4 Tage lang mit Thyroxin vorbehandelt wurden. Wie beim Cysteamin erhöhte sich die Überlebensquote. Wenngleich der Lungenbefund qualitativ noch gegeben war, so war er doch quantitativ signifikant reduziert und entsprach bei den überlebenden Tieren der Norm.

Die Untersuchungen mit Atropin brachten keine neuen Gesichtspunkte. Es trat auch nach „Hemmung des Parasympathicus" keine größere Giftigkeit des Thioharnstoffes ein, wie man dies hätte bei Auslösung des Effektes über den Sympathicus erwarten können.

Zusammenfassung

Es wird an Ratten die Vergiftung mit Thioharnstoff verfolgt. Adrenalektomie, Hydergin, Megaphen und Atropin können die Todesrate nicht beeinflussen. Nur Cysteamin- und Thyroxinprämedikation ist dazu in der Lage. Der nach Thioharnstoff eintretende Tod hat offenbar eine zentralnervöse und eine pulmonale Ursache. Die als Pneumonose zu bezeichnenden Lungenveränderungen werden bei verschiedenster Vorbehandlung nur quantitativ, nicht qualitativ verändert, wobei nur höchste Megaphengaben, sowie Cysteamin oder Thyroxin den kräftigsten Effekt aufweisen. Eine Erklärung für die Cysteamin-Thyroxin-Wirkung kann zur Zeit nicht gegeben werden. Die nach Thioharnstoff auftretenden pulmonalen Veränderungen können nicht auf sympathicotone Erregungsvorgänge zurückgeführt werden.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literatur

Brauer, L.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **1932**, 120. — Cassen, B., K. Kistler and W. Mankiewicz: J. Aviation Med. **23**, 115 u. 120 (1952). — Cassen, B., and K. Kistler: Amer. J. Physiol. **178**, 49 u. 53 (1954). — Courvoisier, S., J. Fournel, R. Ducrot, M. Kolsky et P. Koetschet: Arch. internat. Pharmacodynamie **92**, 305 (1953). — De Ritis, F., e L. Scalfi: Boll. soc. ital. Biol. sper. **20**, 438 (1945). — Dieke, S. H., and C. P. Richter: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **83**, 195 (1945). — DuBois, K. P., L. W. Holm and W. L. Doyle: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **87**, 53 (1946). — DuBois, K. P., R. G. Herrmann and W. F. Erway: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **89**, 186 (1947). — Fitzhugh, O. G., and A. A. Nelson: Science (Lancaster, Pa.) **108**, 626 (1948). — Friedenwald, J. S., and W. Buschke: Amer. J. Physiol. **140**, 367 (1943). — Glass, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **136**, 88 (1928). — Glock, G. E.: Nature (Lond.) **156**, 508 (1945). — Grandpierre, R., et P. Grognot: J. de Physiol. **46**, 375 (1954). — Griesbach, W. E., T. H. Kennedy and H. D. Purves: Nature (Lond.) **154**, 610 (1944). — Grognot, P., et J. Chomé: C. r. Soc. Biol. (Paris) **148**, 1474 (1954). — Horst, H. G., H. Legler u. F. Wegener: Z. exper. Med. **116**, 179 (1950). — Horst, H. G.: Ärztl. Wschr. **1952**, 35. — Jarisch, A., H. Richter u. H. Thoma: Klin. Wschr. **1939**, 1440. — Jarisch, A., u. H. Thoma: Klin. Wschr. **1940**, 76. — Koch, R., u. W. Schwarze: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 428 (1955). — Küchler, A., u. R. Koch: Klin. Wschr. **1955**, 426. — Langendorff, H., R. Koch et U. Hagen: Arch. internat. Pharmacodynamie 1955 (im Druck). — Luisada, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **132**, 313 (1928). — MacKenzie, J. B., and C. G. MacKenzie: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **54**, 34 (1943). — Marine, D., and E. J. Baumann: Amer. J. Physiol. **144**, 742 (1945). — May, L. G., R. W. Moseley and J. C. Forbes: Endocrinology (Springfield, Ill.) **38**, 147 (1946). — Meyer, A. E., M. B. Collins and D. Marine: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **55**, 221 (1944). — Richter, C. P., and K. H. Clisby: Arch. of Path. **33**, 46 (1942). — Richter, C. P.: J. Amer. Med. Assoc. **129**, 927 (1945). — Recent Progr. in Hormone Res. **2**, 255 (1948). — Riechert, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 321 (1951). — Riechert, W., u. H. Barghorn: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **221**, 489 (1954).

Dr. R. Koch, Biophysikal. Abtlg. d. Heiligenberg-Institutes, Heiligenberg/Baden

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 246—249 (1955)

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. W. Hueck)

Über die Wirkung reiner Crataegus-Säuren

Von
H. Fischer und H. Bayerle

(Eingegangen am 20. Oktober 1955)

Die pharmakologische und klinische Untersuchung der Wirkung von Crataegus-Säuren auf den tierischen und menschlichen Organismus insbesonders auf Herz und Kreislauf, ist noch im vollen Gange. Während früher nur Gesamtextrakte des Weißdorns zur Verfügung standen, ist es inzwischen möglich geworden, reine Crataegus-Säuren in Form der Triterpensäuren: Crataegolsäure, Oleanolsäure und Ursolsäure herzustellen. Damit ergibt sich die Möglichkeit einer Erprobung dieser Substanzen in genau dosierter Form.

Lasch, Renner u. Schneider arbeiteten mit einem Gemisch von Natriumsalzen der Crataegus-Säuren, das nicht oder nur zum geringsten Teil wasserlöslich war und daher nicht injizierbar erschien, wenn auch im Tierversuch nach Injektion keinerlei spezifisch-toxische Erscheinungen oder lokale Reizungen auftraten. Auch bei Fütterungsversuchen an Ratten und Meerschweinchen konnte keine Toxicität nachgewiesen werden. Bei klinischen Untersuchungen hat sich eine Dosierung von 3mal 50—60 Tropfen (= 3mal 25—30 mg) oder 3mal 3—4 Tabletten (= 3mal 45—60 mg) pro Tag gut bewährt. Eine sichere Wirkung auf die Herzleistung konnte erzielt werden in Form einer Verkürzung der Austreibungszeit. Eine sichere physiologische Wirkung war die Senkung des Milchsäure- und Brenztraubensäurespiegels im Blut. In vielen Fällen wurde auch eine deutliche Hebung der T-Zacken im EKG beobachtet. Die Ursache dieser Wirkung der Crataegus-Säuren sehen die Untersucher in einer besseren Durchblutung des Herzmuskels, d. h. der Beseitigung einer Coronarinsuffizienz, wodurch eine bessere Herzleistung zustande kommt. Damit werden die Arbeiten von Schimert und Schimert u. Blömer bestätigt, welche eine lang anhaltende Steigerung der Coronardurchblutung als Folge der Gefäßerweiterung aufzeigten. Diese Steigerung ist unabhängig vom Blutdruck und Minutenvolumen. Dörner u. Kuschke lehnen auf Grund ihrer Versuche an Hunden, Kaninchen und Meerschweinchen eine direkte coronargefäßerweiternde Wirkung der Crataegus-Säuren ab. Sie betrachten alle Veränderungen der von ihnen registrierten Größen, einschließlich der Coronardurchblutungssteigerung als Folge einer durch Lungenschädigung hervorgerufenen, asphyktischen Atem- und Kreislaufumstellung. Die Lungenschädigung entstehe sowohl durch den als Lösungsmittel der Crataegus-Säuren nötigen 96%igen Alkohol, als auch durch die im Blut ausfallenden Crataegus-Säuren. Hinsichtlich des Wirkungsunterschiedes von freien Crataegus-Säuren und ihren Natriumsalzen konnte festgestellt werden, daß letztere im allgemeinen schwächer wirksam waren. Im Mittelpunkt der Wirkung einer intravenösen Injektion von in Alkohol gelösten Crataegus-Säuren steht nach Dörner u. Kuschke eine Atemsteigerung, verursacht durch eine Behinderung des

Gasaustausches in der in Folge toxischer Gefäßschädigung ödematösen und von diffusen Hämorrhagien durchsetzten Lunge. Die Höhe der Dosierung belief sich bei den Versuchen dieser Autoren bei Hunden auf 0,1—2,0 mg/kg in 1—2 cm³ 96%igem Alkohol. Die intravenösen Injektionen wurden in eine Vena femoralis bei einer Injektionsgeschwindigkeit von ½ min mit einem Injektionsabstand von ½—1½ Std vorgenommen. Nach Verabreichung einer individuell wechselnden Gesamtdosis trat regelmäßig und meist plötzlich der Tod ein. Die Gesamtmenge der von Dörner u. Kuschke pro Kilogramm Körpergewicht verwendeten Crataegus-Säuren (freie und Na-Salze) betrug zwischen 3,5 und 18,0 mg; ein Hund erhielt 33,8 mg. Auch bei Meerschweinchen führten intravenöse Injektionen von 20—40 mg/kg in NaCl-Lösung suspendierten Crataegus-Säuren mit einem geringen Zusatz von n-Diäthylacetamid unter sichtbarer Steigerung der Atemexcursionen und Trachealrasseln zum Tode der Tiere.

Da uns die Arbeiten von Ullsperger über die Beeinflussung des Milchsäurespiegels im Blut durch Crataegus und von Büchmann, Reebstein u. Ullsperger über die Bedeutung der Milchsäurebestimmung im Blut für die Diagnostik und Behandlung von Herzkrankheiten wichtig scheinen, haben wir eigene experimentell-morphologische Untersuchungen zur Wirkung und Toxicität der reinen Crataegus-Säuren durchgeführt.

Wir verwendeten für unsere Versuche an Kaninchen (von 2,5—4,5 kg) eine Substanzmischung von Triterpensäuren (Ursolsäure, Oleanolsäure, Crataegolsäure), also etwa dieselben Präparate wie Dörner u. Kuschke, aber mit dem nicht unwesentlichen Unterschied, daß unsere Präparate nach einem Verfahren von Ullsperger in Wasser oder NaCl 0,9%ig vollkommen löslich sind. Wir danken Herrn Dr. Ullsperger auch an dieser Stelle für die Überlassung der Präparate. Die verwendeten völlig klaren Lösungen enthielten 25 mg/cm³. Eine weitere Verdünnung verursachte weder Niederschlag noch Trübung. Die Injektionen erfolgten langsam in die Ohrvenen der Tiere, und zwar in Abständen bis 9mal täglich. Einem Tier wurden 21 Tage lang täglich 1 mg/kg injiziert. Auffallend war bei den meisten Tieren eine etwa nach 10—20 min auftretende individuell verschiedene, im allgemeinen aber geringe Tachypnoe. Häufig trat diese Tachypnoe erst nach der 2. oder 3. Injektion auf, nahm aber mit der Versuchsdauer nicht zu. Man gewann den Eindruck, daß sie mehr vom Tier selbst, als von der Höhe der Dosierung abhängig ist. Zum Spontantod eines Tieres im Laufe des Versuches kam es im Gegensatz zu Dörner u. Kuschke in keinem Fall, obwohl unsere gesamte Dosierung meist erheblich höher lag. Eine Übersicht bietet Tab. 1.

Der Versuch 1 wurde nach 2 Tagen wegen Ergebnislosigkeit abgebrochen, da das Tier außer einer zeitweiligen sehr geringen Tachypnoe völlig unauffällig erschien. Bei Tier 2 trat nach der 3. und 4. Injektion eine stärkere Tachypnoe auf, die längere Zeit anhielt. Wir dachten zuerst an eine Kumulationswirkung, mußten aber von dieser Ansicht wieder abrücken, da bei den späteren Injektionen keine Tachypnoe mehr

auftrat und sich eine ähnliche Wirkung bei anderen Tieren nicht zeigte, auch nicht bei höherer Dosierung. Eine Kontrolle dieser Dosis bei einem weiteren Tier (7) führte zu keinem Ergebnis. So bleibt nichts anderes übrig, als diesen Befund als eine Reaktionsform des betreffenden Tieres anzusehen bei einer unspezifischen Lungenaffektion, wie sie bei Kaninchen ja häufig ist, und nicht als eine Wirkung der injizierten Substanz.

Das Tier 3 diente zum Dauerversuch über 21 Tage. Es traten keinerlei Kumulationserscheinungen auf, und das Tier war unauffällig bis auf

Tabelle 1

	Einzel-Dosis mg/kg	Gesamt-Dosis mg/kg	Zahl der Injektionen	Bemerkungen
Tier 1	0,5	6,5	13 in 2 Tagen	Versuch abgebrochen
Tier 2	2,0	28,0	14 in 2 Tagen	Tod durch Nackenschlag
Tier 3	1,0	21,0	21 in 21 Tagen	„
Tier 4	4,0	28,0	7 in 1 Tag	„
Tier 5	6,0	72,0	12 in 2 Tagen	„
Tier 6	18,0	162,0	9 in 1 Tag	„
Tier 7	2,0	18,0	9 in 1 Tag	Versuch abgebrochen
Tier 8	25,0	75,0	3 in 1 Tag	Tod durch Nackenschlag

einen stärkeren Katarrh, der mit geringer Freßlust und damit einem Gewichtsrückgang verbunden war.

Die Tiere 4, 5, 6 u. 8 zeigten, wie schon erwähnt, eine mehr oder weniger lang anhaltende, meist geringe Steigerung der Atemfrequenz und Atemtiefe. Allgemein thrombosierten an den Injektionsstellen bald die Venen und führten häufig zum völligen Verschluß des Gefäßlumens. Vereinzelt kam es auch hier zu einem Ödem der Ohrwurzel.

Die Ursache der auftretenden Tachypnoe suchten wir in einem geringen passageren Lungenödem, zumal auch die Versuche von Dörner u. Kuschke in diese Richtung wiesen. Da kein Spontantod eines Tieres eintrat, wurde eine nach der letzten Injektion etwa auftretende Tachypnoe abgewartet und das Tier dann durch Nackenschlag getötet, um weitere Affektionen der Lunge auszuschalten. Die Sektion der Tiere ergab im allgemeinen den gleichen Befund, so daß die Ergebnisse gemeinsam abgehandelt werden können.

Zur histologischen Untersuchung wurden Gewebsstücke aus verschiedenen Organen entnommen, in Formalin fixiert, in üblicher Weise in Paraffin eingebettet und die Schnitte mit Hämalaun-Eosin gefärbt. Der Fettnachweis in der Leber erfolgte an sudangefärbten Gefrierschnitten.

Die *Lungen* waren makroskopisch blaß, sehr gut lufthaltig, die Pleura glatt. Es zeigte sich nicht der geringste Anhalt für Blutungen oder Ödembildungen. — Histologisch: ungleichmäßige Beatmung; stellenweise kleine emphysematöse, bzw. atelektatische Bezirke. Bei einigen Tieren beobachteten wir in diesen atelektatischen Bezirken Leukocyten, die bei stärkerer Ausbildung das Bild miliarer bronchopneumonischer Herde ergaben. Hin und wieder war eine Schwellung und Ablösung der Alveolarepithelien auffällig. Wir halten diese Herde nicht für verursacht durch die injizierte Substanz, da sie unabhängig von der Höhe der Dosis und der Dauer

des Versuches auftraten. Auch konnte mikroskopisch kein Nachweis kristalliner Teile geführt werden. Lediglich bei Tier 2 fanden sich die basalen Partien der Unterlappen etwas dunkler gefärbt mit vereinzelten kleinen Atelektasen. Mikroskopisch sah man dort kleine bronchopneumonische Herde und hin und wieder geringe Ödembildung sowie Schwellung und Ablösung der Alveolarepithelien. In einzelnen Arterienästen fanden sich deutlich kleine, frische Thromben. Die Gefäße und Bronchien waren unauffällig.

Herz. Schlaff; makroskopisch wie mikroskopisch unauffällig.

Leber. Bei Tier 2 und 4 geringer gelblicher Farbton des Organs, sonst unauffällig. Die erwähnten Tiere wiesen eine stärkere, vorwiegend kleintropfige, periphere bzw. diffuse Fettablagerung in der Leber auf, wie Sudanpräparate zeigten. Der Befund an hellen, pflanzenzellenartigen Leberzellen (Glykogen?) ist bei den einzelnen Tieren wechselnd. Eine mitunter zu beobachtende geringgradige Verbreiterung der Glissonschen Dreiecke steht sicherlich nicht mit der Injektionssubstanz im Zusammenhang.

Die *Nieren* boten sowohl makroskopisch wie mikroskopisch keinen besonderen Befund.

Milz nicht vergrößert; histologisch mitunter reichlich Leukocyten in den Sinus.

Nebennieren unauffällig.

Unsere makroskopischen und mikroskopischen Befunde ergaben keinerlei Anhalt einer morphologisch faßbaren toxischen Organschädigung bei den geprüften Versuchsmengen. Insbesondere konnten wir im Gegensatz zu Dörner u. Kuschke weder Hämorrhagien noch Ödeme der Lungen beobachten.

Zusammenfassung

Prüfung der Toxicität reiner Crataegus-Säuren. Bei intravenöser Injektion dieser Substanzen in Einzeldosen von 0,5—25,0 mg/kg Körpergewicht tritt eine geringgradige, individuell verschiedene Tachypnoe auf. Morphologische Befunde einer Schädigung sind weder an den Lungen noch an anderen Organen nachweisbar. Am Applikationsort kommt es zu Venenthrombosen.

Literatur

Büchmann, P., H. Reebstein u. R. Ullsperger: Med. Klin. **1954**, 136. — Dörner, J., u. H. J. Kuschke: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **324**, 24 (1955). — Dtsch. med. Wschr. **1955**, 691. — Lasch, F., B. Renner u. G. Schneider: Münch. med. Wschr. **1954**, 1253. — Schimert, G.: Z. exper. Med. **113**, 113 (1944). — Schimert, G., u. H. Blömer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 337 (1953). — Ullsperger, R.: Pharmazie **9**, 330 (1954); **7**, 211 (1952).

Dr. phil. Dr. med. H. Bayerle, München, Pathologisches Institut der Universität, Thalkirchner Str. 36

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 250—258 (1955)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Freiburg/Brsg.
(Direktor: Prof. Dr. S. Janssen)

Die Beeinflussung der Coronardurchblutung durch blutdruckwirksame Drogen bei intracoronarer und intravenöser Injektion

Von
O. Heidenreich und L. Schmidt

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Juli 1955)

Die Voraussetzung für eine rationelle Anwendung von Medikamenten, welche die Coronardurchblutung verbessern, ist die Klärung der Frage, durch welche Faktoren die Coronardurchblutung beeinflußt wird. Trotz zahlreicher Untersuchungen ist es bisher nicht gelungen, dieses Problem eindeutig zu lösen.

Da die Ergebnisse älterer Untersuchungen wegen unzulänglicher Methoden meist schwer zu beurteilen sind, seien aus der Literatur nur einige neuere Arbeiten zitiert.

Gollwitzer-Meier, Ginty, Kinoshita vertreten die Ansicht, daß sich die Coronardurchblutung gegenüber dem arteriellen Blutdruck druckpassiv verhält. Zu dem gleichen Ergebnis kamen Klisiecki u. Fleck nach Untersuchungen mit der Photohämotachometer-Methode; ebenso fanden Hausner u. Mitarb. am Herz-Lungenpräparat mit der Thermostromuhr eine deutliche Abhängigkeit des Coronardurchflusses vom arteriellen Blutdruck. Eckenhoff schreibt nach Versuchen mit der Stickoxydul-Methode der Coronardurchblutung eine gewisse Blutdruckabhängigkeit zu, nimmt aber keine absolute Druckpassivität der Coronarien an. Green fand bei dekompensierter Aorteninsuffizienz eine erhebliche Verminderung der Coronardurchblutung. Rein dagegen vertritt die Ansicht, daß weder der arterielle Blutdruck, noch die vegetativ nervöse Versorgung der Kranzgefäße einen Einfluß auf die Größe der Coronardurchblutung hätten, sondern allein die arterielle Sauerstoffspannung für die Größe des Coronardurchflusses verantwortlich sei. Weiterhin kann Rein eine maximale Erweiterung der Coronarien am insuffizienten Herzen beweisen. Die maximal erweiterten Coronarien reagieren nach Rein stets druckpassiv. Nach den Untersuchungen von Schmidt u. Engelhorn mit dem Eckenhoffschen Bubble-flow-meter bei gleichzeitiger Druckregistrierung in der linken Coronararterie hat der arterielle Blutdruck einen deutlichen Einfluß auf die Coronardurchblutung.

Im folgenden wurde der Versuch gemacht, die Frage nach einigen Faktoren, welche die Coronardurchblutung beeinflussen, mit verbesserter Methodik zu prüfen.

Methodik

Bei intravenöser Injektion coronarwirksamer Drogen ist die Auswertung der Ergebnisse schwierig, weil sich der Blutdruck meist gleichzeitig mit der Coronardurchblutung ändert. Die beiden Faktoren lassen sich dann nicht mehr sicher gegeneinander abgrenzen. Diese Schwierigkeit kann durch intracoronare Injektion der Wirkstoffe vermieden werden. Bei Verwendung sehr geringer Dosen wird hierbei der Blutdruck nicht beeinflußt. Bei einem Vergleich der Kurven, die mit intracoronarer und intravenöser Injektion gewonnen werden, läßt sich der Einfluß des Blutdrucks auf die Coronardurchblutung leicht erkennen.

Wir registrierten die Coronardurchblutung mit dem Bubble-flow-meter nach Eckenhoff, Hafkenschiel u. Landmesser. Diese Methode erlaubt es, auch intracoronare Injektionen vorzunehmen. Sie wurde durch Baumgartner, Grupp u. Janssen wesentlich verbessert. Der Eintritt und der Austritt der Luftblase, welche vollautomatisch durch eine Pumpe eingesetzt wird, wird durch zwei eingebaute Photozellen registriert. Dadurch kann die Meßstrecke wesentlich verkürzt werden, so daß sich auch geringste Veränderungen erfassen lassen. Die Impulse kommen über einen Verstärker zu einem Ordinatenschreiber. Dieser zeichnet den Zeitabstand zwischen dem Ein- und Austritt der Blasen in Form senkrechter Linien auf einer Rußkurve auf. Kürzere Linien bedeuten einen schnelleren Blutdurchfluß. Das System wird durch einen Höppler-Thermostaten gleichmäßig aufgewärmt.

Registriert wurde bei diesen Versuchen die Durchblutung des Ramus descendens der linken Coronararterie; das Blut wurde aus der Art. carotis communis sinistra über das Meßgerät in diesen Coronarast geleitet. Weiterhin registrierten wir den Blutdruck in der Art. femoralis.

Gerinnungshemmung erfolgte durch *Heparin Novo* (Terapeutisk Laboratorium Kopenhagen), 350 Einheiten/kg.

Versuchstiere waren Hunde von 20—35 kg. (Narkose: Numal 50 mg/kg.)

Insgesamt wurden 35 Versuche durchgeführt. Die Hälfte der Tiere wurde mit der Starlingschen Atempumpe beatmet. Die übrigen atmeten nach Naht des Herzbeutels und schichtweisem Verschluß des Thorax spontan.

Untersucht wurde die Wirkung von Papaverin, Toncphin und Acetylcholin auf die Coronardurchblutung und den Blutdruck bei intracoronarer und intravenöser Injektion. Die Dosisangaben beziehen sich immer auf den ganzen Hund.

Ergebnisse

1. Papaverin. Abb. 1 zeigt die Veränderungen von Blutdruck und Coronardurchfluß nach *intracoronarer* Injektion von 5 mg Papaverin. Sofort nach der Injektion erweitern sich die Kranzgefäße und der Durchfluß erhöht sich wesentlich. Mit sehr geringer Verzögerung sinkt auch der Blutdruck um 20 mm Hg. In diesem Moment wird der Coronardurchfluß deutlich schlechter, verbessert sich aber mit dem Anstieg des Blutdrucks wieder. Im folgenden klingt die Papaverinwirkung ab, Blutdruck und Coronardurchfluß kehren zu den Ausgangswerten zurück. Die Wirkung einer *intravenösen* Injektion von 20 mg Papaverin zeigt Abb. 2.

Die verhältnismäßig hohe Dosis bewirkt eine kurzdauernde Blutdrucksenkung von 40 mm Hg. Wenige Sekunden nach der Injektion

verringert sich der Coronardurchfluß. Sein niedrigster Wert fällt zeitlich mit der stärksten Blutdrucksenkung zusammen. Zwei Minuten nach der Injektion sind Blutdruck und Coronardurchfluß wieder normal.

2. Tonephin. Abb. 3 zeigt eine für Tonephin typische Blutdruck- und Coronardurchflußkurve.

Unmittelbar nach der intracoronaren Injektion verengern sich die Kranzgefäße. Die Durchblutung wird sehr gering, die Luftblase bewegt sich innerhalb des Bubble-flow-meters daher kaum noch vorwärts. Nach zwei Minuten löst sich

Abb. 1

Abb. 2

Abb. 1. Hund, 22 kg, künstliche Atmung. Oben: Blutdruck (Art. femoralis, Membranmanometer); unten: Coronardurchblutung (kürzere Linien = vergrößerter Durchfluß). Zeitschreibung: 10 sec. Beim ↑ 5 mg Papaverin intracoronar

Abb. 2. Hund 23,5 kg, künstliche Atmung. Oben: Blutdruck (Art. femoralis, Membranmanometer), unten: Coronardurchblutung (längere Linien = verminderter Durchfluß). Zeitschreibung: 10 sec. Beim ↑ 20 mg Papaverin i.v.

der Coronarspasmus wieder, die Durchblutung wird besser und erreicht nach 4—5 min den ursprünglichen Wert. Gleichzeitig mit dem Entstehen des Coronarkrampfes sinkt der arterielle Blutdruck um 20 mm Hg, um nach Verbesserung der Coronardurchblutung wieder anzusteigen. Die Blutdrucksenkung kommt durch die Herzinsuffizienz infolge des

Coronarspasmus zustande, da bei dieser intraçoronaren Injektion von Vasopressin die Wirkung auf die Kranzgefäße im Vordergrund steht.

Nach einer intravenösen Injektion von 5 VE Tonephin (Abb. 4) sinkt nach einem kurzen initialen

Abb. 3

Abb. 4

Abb. 3. Hund 34 kg, künstliche Atmung. Oben: Blutdruck (Art. femoralis, Membranmanometer); unten: Coronardurchblutung (längere Linien = verminderter Durchfluß). Zeitschreibung: 10 sec. Beim↑ 0,2 VE Tonephin i.c.

Abb. 4. Hund 22 kg, Spontanatmung. Oben: Blutdruck (Art. femoralis, Membranmanometer); unten: Coronardurchblutung (kürzere Linien = vergrößerter Durchfluß). Zeitschreibung: 10 sec. Beim ↑ 5 VE Tonephin i.v.

Blutdruckanstieg der Blutdruck plötzlich um 60 mm Hg ab, steigt dann erneut an und bleibt 30—40 min auf einem gegenüber der Ausgangslage um 70 mm Hg erhöhten Niveau. Unmittelbar nach der Injektion *vergrößert* sich der Coronardurchfluß deutlich. Diese Durchflußvermehrung fällt

zeitlich mit dem primären Ansteigen des Blutdrucks zusammen. 40 sec später kommt es zum Coronarspasmus, der am Blaßwerden des Herzens und an der hochgradigen Durchblutungsverminderung in der Kurve zu erkennen ist. Wie bei der intracoronaren Injektion löst sich auch hier der Spasmus nach etwa 2 min, die Coronardurchblutung wird im folgenden höher, sogar etwas besser als vor der Injektion von Tonephin.

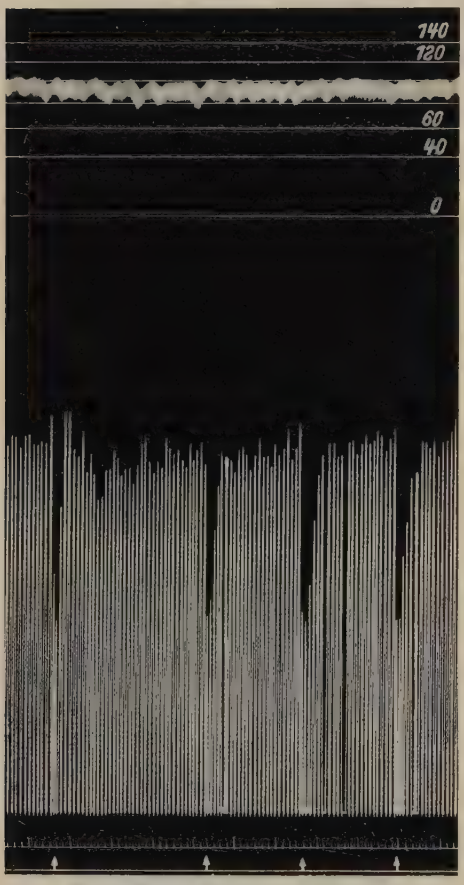


Abb. 5. Hund 34 kg, Spontanatmung. Oben: Blutdruck (Art. femoralis, Membranmanometer); unten: Coronardurchblutung (kürzere Linien = vergrößerter Durchfluß). Zeitschreibung: 10 sec. Bei den ↑ 0,1 γ, 0,2 γ, 0,5 γ, 1 γ Acetylcholin i.c.

3. Acetylcholin. Als letzter Wirkstoff wurde Acetylcholin in kleinsten, intracoronar injizierten Dosen untersucht.

Schon 0,1 γ Acetylcholin bewirken bei *intracoronarer* Applikation eine deutliche Kranzgefäßerweiterung und Durchblutungsvermehrung. Diese Wirkung ist in ihrer Dauer dosisabhängig und stets reproduzierbar. Eine Beeinflussung des Blutdrucks kam durch die verwendeten geringen Dosen nicht zustande. Die Blutdruckschwankungen in der Kurve sind respiratorisch bedingt. Am atropinisierten Tier bleibt jede Wirkung von Acetylcholin auf die Kranzgefäße aus.

Bei *intravenöser* Injektion führten Dosen von 0,1 γ — 1 γ in unseren Versuchen weder eine Änderung des Blutdrucks noch der Coronardurchblutung herbei. Größere Dosen bewirkten Blutdrucksenkungen mit gleichzeitiger Verminderung der Coronardurchblutung (siehe auch Schmidt u. Engelhorn).

Diskussion

Es scheint uns zunächst wichtig, daß die Atmung, gleichgültig ob sie spontan war, oder mit Hilfe der Starling-Pumpe durchgeführt wurde, keinen Einfluß auf die von uns erhobenen Befunde hatte.

1. Papaverin wirkt auf die glatte Muskulatur tonussenkend. Bei intracoronarer Injektion von Papaverin kommt es zu einer Erweiterung der Kranzgefäße und einer Zunahme der Durchblutung (Abb. 1). Sobald das Papaverin in den großen Kreislauf gelangt, sinkt der Blutdruck durch die Erweiterung der Gefäße in der Peripherie. Die in diesem Stadium des Blutdruckabfalls zeitlich mit der stärksten Drucksenkung zusammenfallende Verringerung der Coronardurchblutung spricht eindeutig für eine Abhängigkeit der Kranzgefäßdurchblutung vom Blutdruck. Intravenöse Injektion von Papaverin führt zu einem Absinken des Blutdrucks. Hierbei kommt es in der Regel sogar zu einer Minderdurchblutung der Kranzgefäße, obwohl diese durch Papaverin erweitert werden, wie die intracoronare Injektion zeigt. Bei der intravenösen Injektion ist die Konzentration in den Kranzgefäßen natürlich relativ klein und die entsprechend geringe Erweiterung wird durch den sinkenden Blutdruck vollständig überdeckt (Abb. 2).

Dieser Befund läßt sich dadurch deuten, daß die tonussenkende Wirkung des Papaverins um so deutlicher ist, je höher der Tonus der glatten Muskulatur liegt. Da wir in unseren Versuchen Hunde mit gesunden Kranzgefäßen und normalem Tonus verwendeten, wirkte sich bei intravenöser Injektion die Blutdrucksenkung stark aus, wobei die gefäßerweiternde Wirkung an den Coronarien infolge der geringen Konzentration nicht zum Ausdruck kam. Bei einem Coronarspasmus, wie er zum Beispiel durch Tonephin erzeugt werden kann, erweitert Papaverin die Herzkranzgefäße auch nach intravenöser Injektion (siehe Rössler und Schmidt).

2. Tonephin hat eine dem Papaverin entgegengesetzte Wirkung: Blutdrucksteigerung, Verengung der Coronargefäße.

Die Coronarwirkung wurde am Herz-Lungenpräparat durch Anrep u. Stacey, Bodo, Häussler und Rössler nachgewiesen. Goldenberg u. Rothberger, Dietrich, Gruber und Kountz konnten diese Befunde durch elektrocardiographische Untersuchungen bestätigen. Sie fanden im Elektrokardiogramm die gleichen Veränderungen wie bei Erstickung oder nach Coronarunterbindung: Die Nachschwankung wurde hoch und spitz und rückte oft in die Initialschwankung hinein, wobei T dann vom absteigenden Schenkel des R abging. Auch am künstlich durchströmten Herzen wurde die coronarverengernde Wirkung des Vassopressins durch Dale sowie Katz u. Mitarb. beobachtet.

Durch die intracoronare Injektion des Vasopressins konnten wir die eben beschriebenen Befunde bestätigen. Wir injizierten geringe Dosen (von 0,1—0,3 VE) intracoronar und erhielten dadurch Coronarspasmen von 1—3 min Dauer. Der Coronarspasmus bewirkt eine Ischaemie des Herzens, welche zu einer akuten Insuffizienz führt. Dadurch sinkt der arterielle Blutdruck für kurze Zeit ab. Die relativ schnelle Lösung des Krampfes wird von Markwalder u. Starling durch den einsetzenden hochgradigen Sauerstoffmangel und das Auftreten nicht flüchtiger

Stoffwechselprodukte des Herzmuskels erklärt. Wir injizierten in einigen Versuchen auch große Dosen von Tonephin. Diese bewirkten dann stets eine vollständige Sperre der Coronardurchblutung und den baldigen Tod unserer Versuchstiere. Anders ist das Bild bei intravenöser Injektion von Tonephin. In diesem Falle steigt der Blutdruck zunächst an. Parallel dem initialen Blutdruckanstieg geht eine Vergrößerung der Coronardurchblutung, welche bei intracoronarer Zuführung von Vasopressin nie beobachtet werden konnte. Es kann sich hier also keinesfalls um eine spezifische Tonephinwirkung handeln. Wir sind der Ansicht, daß durch den zunächst ansteigenden Blutdruck die Coronardurchblutung verbessert wird. Im weiteren Verlauf eines solchen Versuches tritt ein Coronarspasmus auf und der Blutdruck sinkt steil ab. Erst nach Lösung des Coronarkrampfes kommt dann die blutdrucksteigernde Wirkung des Vasopressins voll zum Ausdruck. Gleichzeitig normalisiert sich auch der Coronardurchfluß.

3. Acetylcholin wirkt über eine Erweiterung der peripheren Gefäße blutdrucksenkend. Nach der vorherrschenden Meinung wirken jedoch cholinergische vagale Reize auf die Coronararterien konstriktorisch.

Die Angaben in der Literatur über die Wirkung des Acetylcholins auf die Coronargefäße sind dagegen nicht einheitlich. Wedd untersuchte die Acetylcholinwirkung auf die Coronarien des Hundes mit Hilfe der Morawitz-Kanüle. Bei der Mehrzahl seiner Versuche fand er eine anfängliche Verbesserung der Coronardurchblutung, welche durch Minderdurchblutung abgelöst wurde. In anderen Fällen sah er aber auch eine Durchblutungssteigerung *oder* eine Verminderung des Durchflusses. Seine Ergebnisse sind daher schwer zu beurteilen.

Die Acetylcholinwirkung bei intracoronarer Injektion wurde bisher nicht untersucht. In unseren Versuchen sahen wir schon nach Dosen von 0,1 γ Acetylcholin regelmäßig eine Coronarerweiterung ohne biphasischen Kurvenverlauf, wie er von Wedd beschrieben wurde. Diesen konnten wir auch bei größeren intracoronar verabreichten Dosen bis zu 1 mg nie beobachten. Bewirken sehr hohe Dosen intracoronar gegeben auch eine Blutdrucksenkung, so lassen sich ähnliche Kurvenbilder erhalten, wie sie bei der intracoronaren Injektion von Papaverin gesehen wurden. Das Ausbleiben der Acetylcholinwirkung auf den Coronardurchfluß des atropinsierten Hundes beweist die direkte Acetylcholinwirkung auf die Kranzgefäße und schließt den Weg über eine Reizung sympathischer Ganglien aus. Da Acetylcholin auf die Herzkranzgefäße ebenso wie auf die anderen Arterien erweiternd wirkt, wird eine coronarkonstriktorische Wirkung von Vagusreizen fragwürdig. Katz u. Jochim vermuten, daß coronarverengernde Nerven adrenergischen Charakter haben und über den Sympathicus laufen. Diese Frage ist bei Hunden noch ungeklärt und erfordert weitere Untersuchungen. Intravenöse Injektion von Acetylcholin bewirkt Blutdruckabfall und verringerte Coronardurchblutung.

Die Verhältnisse liegen hier ähnlich wie beim Papaverin und lassen die gleichen Schlußfolgerungen zu. Auch hier entzieht sich die geringe Coronargefäßerweiterung dem Nachweis, weil der sinkende Blutdruck zu einer Minderdurchblutung führt.

Die Erweiterung der Coronargefäße durch intracoronar injizierte Pharmaka beweist, daß unsere Befunde nicht an insuffizienten Herzen erhoben wurden. Wenn im Verlauf unserer Versuche mit zunehmender Versuchsdauer die Herzen insuffizient wurden, so ließ sich weder durch Papaverin noch durch Acetylcholin eine Erweiterung herbeiführen. Wir konnten somit die Befunde Reins bestätigen, wonach insuffiziente Herzen maximal erweiterte Coronararterien haben.

Zusammenfassung

1. Papaverin bewirkt bei intracoronarer Injektion zunächst eine Vergrößerung, später parallel mit dem sinkenden Blutdruck eine Verminderung der Durchblutung der Kranzgefäße. Nach intravenöser Injektion ist diese Erweiterung nicht nachweisbar, da sie durch den sinkenden Blutdruck überdeckt wird.

2. Tonephin intracoronar injiziert, führt infolge eines Coronarkrampfes zu einer Durchblutungsminderung. Nach intravenöser Injektion kommt es durch den initialen Blutdruckanstieg druckpassiv zunächst zu einer Vermehrung der Coronardurchblutung. Später wird das Herz insuffizient infolge des einsetzenden Coronarkrampfes. Der Blutdruck sinkt ab, um nach Lösung des Krampfes zusammen mit der Coronardurchblutung die normalen Werte wieder zu erreichen.

3. Acetylcholin erweitert schon in Dosen von 0,1 γ die Coronargefäße. Nach intravenöser Injektion ist diese coronarerweiternde Wirkung, ähnlich wie bei intravenös injiziertem Papaverin, nicht mehr nachweisbar.

Die erhobenen Befunde weisen auf eine gewisse Abhängigkeit der Coronardurchblutung vom arteriellen Blutdruck hin.

Literatur

Andrep, G. V., and R. S. Stacey: J. of Physiol. **64**, 187 (1927). — Antopol u. Rössler: Z. exper. Med. **94**, 453 (1934). — Baumgartner, G., G. Grupp u. S. Janssen: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 251 (1954). — Verh. dtsch. Pharm. Ges. 20. Tagg. — Bodo, R.: J. of Physiol. **64**, 365 (1926/28). — Dale: Biochemic. J. **4**, 427 (1909). — Dietrich, S.: Z. exper. Med. **90**, 689 (1933). — Eckenhoff, I. E.: Amer. J. Physiol. **152**, 545 (1948). — Eckenhoff, I. E., H. J. Hafkenschiel and C. M. Landmesser: J. of Physiol. **148**, 582 (1947). — Ginty, Mc, A. and Daniel: Amer. J. Physiol. **131**, 43 (1940). — Goldenberg, M., u. C. J. Rothberger: Z. exper. Med. **76**, 1 (1930). — Gollwitzer-Meier, Kl.: Pflügers Arch. **240**, 263 (1938). — Green: Amer. J. Physiol. **115**, 94 (1936). — Gruber, C. M., and W. B. Kountz: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **40**, 253 (1930). — Häusler, H.: J. of Physiol. **68**, 324 (1929). — Hausner, Hiram, Herrick and Baldes: Amer. J. Physiol.

131, 43 (1940). — Katz, L. N., and K. Jochim: Amer. J. Physiol. **126**, 395 (1939). — Katz, L. N., E. Lindner, W. Weinstein, D. J. Abramson et K. Jochim: Arch. internat. Pharmacodynamie **59**, 399 (1938). – Kinoshita: Jap. J. med. Sci., Trans **2**, 17 (1931). — Klisiecki u. Fleck: Z. Biol. **97**, 7 (1936), **97**, 12 (1936); **97**, 19 (1936); **97**, 23 (1936); **97**, 34 (1936). — Markwalder, J., and E. Starling: J. of Physiol. **47**, 275 (1913). — Rein, H.: Pflügers Arch. **253**, 205 (1951). — Rössler, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **153**, 1 (1930). — Schmidt, L.: Arzneimittel-Forsch. **1**, 117 (1951). — Schmidt, L., u. R. Engelhorn: Z. exper. Med. **120**, 578 (1953). – Wedd, A. M.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **57**, 179 (1936).

Dozent Dr. med. L. Schmidt, Freiburg/Br., Katharinenstr. 29

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, 259—264 (1955)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. L. Lendle)

Zur Frage der Sensibilisierung des Herzvagus bei der anaphylaktischen Reaktion

Von
H. Göing und U. Hackenberg

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 15. Oktober 1955)

Die Diskussion über die Bedeutung des Nervensystems für die Auslösung und Ausbreitung des allergisch-anaphylaktischen Geschehens ist seit Jahrzehnten im Gange. Besonders die moderne Neuralpathologie hat sich für die Beziehungen zwischen Nervensystem und allergischer Reaktion interessiert und dabei den Anteil des vegetativen Nervensystems bei diesen Vorgängen in den Vordergrund gestellt.

Einen Überblick über die Literatur, die sich mit den Beziehungen von vegetativem Nervensystem und Immunität befaßt, hat erst neuestens Enenkel gegeben und darauf hingewiesen, daß neue russische Arbeiten bei Hemmung des zentralen und peripheren Nervensystems eine Verminderung der Antikörperbildung nachgewiesen haben wollen. Heilmeyer hatte noch den Standpunkt vertreten, daß nur „eine hohe Wahrscheinlichkeit" für eine nervöse Steuerung der Immunkörperbildung bestehe und H. Schmidt meinte, daß nur die Abgabe von Antikörpern in das Blut dem vegetativen Nervensystem unterstehe. Engelhardt und Lendle haben 1955 in einer Studie über serumanaphylaktische Reaktionen am nervenfreien glattmuskeligen Hühneramnion gezeigt, daß eine aktive und passive Immunisierung gegen Serum im bebrüteten Hühnerei erfolgt und am isolierten Amnion nachgewiesen werden kann. Sie haben dort auch einen Überblick über neue experimentelle Arbeiten zur Frage der Beteiligung des Nervensystems gegeben.

Im klinischen Schrifttum wird häufig die Frage gestellt, wie die Immunisierungsvorgänge und Allergiezustände sich ihrerseits auf die Reaktionslage des vegetativen Nervensystems auswirken. Das Bild des anaphylaktischen Schockes (Bronchospasmus und Spasmen anderer glattmuskeliger Organe, Kollaps u. a.) läßt eine gewisse Ähnlichkeit zu parasympathischen Erregungszuständen an glattmuskeligen Organen erkennen. So ist es vielleicht verständlich, daß eine von Heim (1940) aufgestellte These der Vagussensibilisierung beim anaphylaktischen Schock und bei allergischen Krankheiten weitgehend beachtet wurde. Heim nimmt eine primäre Einwirkung des allergisch-anaphylaktischen Geschehens auf das vegetative Nervensystem an. Er beobachtete an Katzen, die mit Fremdeiweiß vorbehandelt worden waren, bei Reizung

des peripheren Vagusstumpfes nach Reinjektion des Antigens eine Verstärkung des Reizerfolges (verstärkte Herabsetzung der Herzfrequenz). Diese Empfindlichkeitssteigerung versuchte er durch eine Cholinesterasehemmung zu erklären. Er fand nämlich bei sensibilisierten Meerschweinchen nach Reinjektion des Antigen-Eiweißes eine Abnahme der Esteraseaktivität des Serums (1946/47).

Eine experimentelle Bestätigung der von Heim am Herzvagus erhobenen Befunde ist unseres Wissens nicht erfolgt.

Andererseits sind beispielsweise von Stern und Balzer (1942) weitere Schlußfolgerungen aus Heims Hypothese im Anschluß an die Vorstellungen von Gremels (1935) über eine Sensibilisierung des Vagus durch Digitalis gezogen worden. Sie glauben aus einer Verstärkung der Digitalis-Toxicität an eiweiß-sensibilisierten Katzen beide Hypothesen gemeinsam bestätigen zu können. Eine Kritik ihrer Befunde und Ausdeutung haben Busse, Göing und Lendle vor kurzem gegeben.

Im folgenden bemühten wir uns unter Anpassung an Heims Methodik, die von ihm beschriebene Sensibilisierung des peripheren Herzvagus zu reproduzieren.

Die Untersuchungsergebnisse von Heim über eine Umstimmung des zentralen Vagustonus und eine Hemmung der Cholinesterase im Blut unterzogen wir keiner Nachprüfung. Schaefer und Maier (1949) haben übrigens kritisch darauf aufmerksam gemacht, daß die Spaltung des Acetylcholins im Blut des Menschen unter physiologischen Bedingungen, d. h. bei kleinen Konzentrationen, fast ausschließlich durch die Esterase der Blutkörperchen erfolgt, nicht durch die Serumesterase. Sie betonen ferner, daß wohl nur die an der Stelle der Nervenübertragung vorhandene Esterase die eigentliche Tonuslage im vegetativen Nervensystem bestimmt und nicht die Esterase im Blut.

Methodik

a) Vorbehandlung. Katzen sind relativ selten zur Klärung allergisch-anaphylaktischer Probleme herangezogen worden. Das hat seinen Grund vermutlich in zwei Eigenarten dieser Tiere: einmal soll bei ihnen verglichen mit Meerschweinchen, Tauben und Kaninchen nur schwerer eine Sensibilisierung gegen Fremdeiweiß zu erreichen sein, jedenfalls wenn man als Maß dafür die Auslösbarkeit eines anaphylaktischen Schockes oder die Schultz-Dale-Reaktion am isolierten glattmuskeligen Organ nimmt; zweitens sollen Katzen auf Eiweißgaben schon bei einer ersten intravenösen Injektion sehr empfindlich — mit Blutdruckabfall evtl. Exitus — reagieren. Die primäre Empfindlichkeit gegen Fremdserum soll gegenüber Hundeserum gering sein, weshalb wir — wie Heim es ebenfalls teilweise tat — Hundeserum verwendeten. Die Sensibilisierung erstrebten wir mit einer Serie von 5 Einzelinjektionen (je 1 cm^3 Hundeserum subcutan u. m.) über 10 Tage hin.

b) Prüfung auf Sensibilisierung. Um im Falle der Sensibilisierung gegen Fremdeiweiß bei der Reinjektion einen starken Blutdruckabfall vermeiden zu können, kam es darauf an, die Dosis des intravenös reinjizierten Fremdeiweißes niedrig zu halten (1 cm^3 oder weniger pro Injektion pro Katze). Damit bestand die Gefahr, daß man — eben wegen des fehlenden Blutdruckabfalles — keine Aussage darüber machen könnte, ob das Versuchstier wirklich gegen Fremdeiweiß sensibilisiert war. Wir entnahmen deshalb den narkotisierten Katzen vor Anschluß der Blutdruckkanüle einen Dünndarmabschnitt und testeten an Hand mehrerer Darmstücke mit der Schultz-Dale-Reaktion auf eine vorhandene Sensibilisierung.

c) Akuter Versuch. Der akute Versuch wurde in Chloralosenarkose (80 mg/kg ohne Urethanzusatz subcutan) vorgenommen. Die Blutdruckregistrierung erfolgte blutig von der linken Art. carotis aus mittels Mareyscher Kapsel am schnellaufenden Rußkymographion, so daß die Pulsfrequenz ausgezählt werden konnte; Zeitschreibung 1 sec mit Jacquet-Uhr. Die Blutdruckkanüle wurde mit Heparin-Ringer oder einer entsprechenden Lösung gefüllt. Da hohe Heparindosen nach einer Reihe von Autoren (VAN DE CARR u. WILLIAMS (1928), KYES u. STRAUSER (1926) u. a.) den Schock abschwächen bzw. verhüten sollen, wurde der Übertritt der blut-

Tabelle 1

Nr.	Datum	Gewicht g	Maßnahmen zur Sensibilisierung	SCHULTZ-DALE Reaktion	Carotissinus-denervierung	Reizung
1	18. 10. 54	2010	—	∅	+	Gesamtspekt.
2	19. 10. 54	2630	+	—	+	„
3	25. 10. 54	1670	+	+	+	„
4	28. 10. 54	1400	+	—	+	„
5	3. 11. 54	3160	—	∅	+	„
6	5. 11. 54	2600	—	∅	+	„
7	3. 12. 54	2200	+	+	+	„
8	7. 12. 54	2890	+	—	+	„
9	8. 12. 54		+	+	Exitus bei Carotissinus-denervierung	
10	10. 12. 54	2400	+	—	+	2 u. 5 Imp./sec
11	17. 12. 54	2250	heterolog-passive Sensibilisierung*	—	—	
					—	„
12	21. 12. 54	2300	+	+?	—	„
13	1. 2. 55	3500	+	—	—	„
14	14. 2. 55	1950	+	—	—	„
15	16. 2. 55	2050	+	+?	—	1 Imp./sec Dauerreiz
16	18. 2. 55	4050	+	—	—	0,5 Imp./sec Dauerreiz

* Serum von gegen Pferdeserum sensibilisierten Meerschweinchen.
∅ SCHULTZ-DALE-Test nicht durchgeführt.

gerinnungshemmenden Lösungen in den Kreislauf weitgehend vermieden*. Es wurde in jedem Falle bivagotomiert, teilweise wurden zur Ausschaltung bzw. Verringerung von Gegenregulationen die Carotis-Sinus denerviert (Präparation und anschließend Verätzung der Sinus mit Trichloressigsäure).

Die Nervenreizung wurde nach der Methode von ERDMANN und MERCKER (1952) vorgenommen.

Dabei wird mit Rechteckimpulsen maximaler Reizstärke in verschiedenen Frequenzen von 0,5 bis 100 Imp./sec gereizt. Der stärkste Reizerfolg liegt etwa bei 20 Imp./sec, mit weniger als 10 Imp./sec wird ein deutlich geringerer Reizerfolg

* Nach HERXHEIMER (1955) bewirken allerdings bis zu 20000 Einheiten/kg Heparin nach intraperitonealer Injektion keinen Schutz bei Testung am „Mikroschock" des Meerschweinchens.

erzielt. Es ist ein Vorzug dieser Methode, daß Veränderungen der Elektrodenlage am Nerven nicht so leicht zu Veränderungen des Reizerfolges führen wie bei der Reizung mit submaximaler Reizstromstärke. Besonders geeignet scheint die Methode, wenn es gilt, eine Abschwächung des Vagusreizerfolges zu erfassen (z. B. Atropin). Sie gestattet jedoch auch besonders im Bereich der Frequenzen < 10 Imp./sec Verstärkungen des Vagusreizerfolges zu beobachten (z. B. Prostigmin).

Die Impulsdauer betrug stets 0,5 msec. In einer Reihe von Versuchen wurde das „Gesamtspektrum" angewandt, d. h. es kamen alle 20 min die Frequenzen 0,5, 2, 5, 10, 20, 50 und 100 Imp./sec unmittelbar aufeinander folgend je 1 min 30 sec lang zur Anwendung. Um die Kreislaufbelastung der je 10 min 30 sec dauernden „Gesamtspektren" zu umgehen, beschränkten wir uns in einem Teil der Versuche auf die Frequenzen 2 und 5 Imp./sec, mit denen wir alle 10 min je 1 min 30 sec lang reizten. Zur Beurteilung des Reizerfolges wurden jeweils die letzten 20 sec der Reizung mit einer Frequenz betrachtet. Schließlich führten wir mit 0,5 bzw. 1 Imp./sec Reizungen von $>$ 1 Std Dauer durch; das Antigeneiweiß wurde dann nicht wie bei der vorhergehend beschriebenen Arbeitsweise zwischen den „Spektren", sondern während der Reizung reinjiziert.

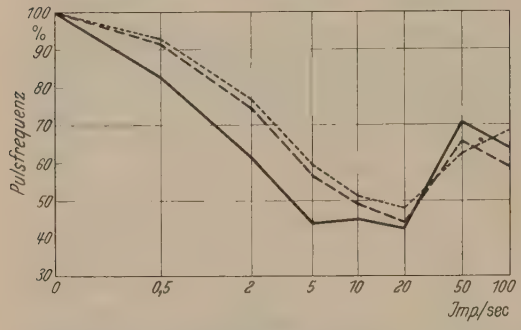


Abb. 1. Frequenzspektrum der Vagusreizung vor und nach Reinjektion des Antigens (Hundeserum). Angabe der Pulsfrequenz in Prozent der Ausgangswerte. ———— vor Seruminjektion, — — — 3. und 4. Test 6 min nach Seruminjektion, ... 5. und 6. Test anschließend

Tab. 1 enthält Angaben über die Anwendung der Reizmodifikation bei den einzelnen Versuchstieren.

Ergebnis

Wir konnten in allen unseren Versuchen bei den Schultz-Dale-positiven sowie bei den übrigen serumvorbehandelten Tieren *nie eine Verstärkung des Vagusreizerfolges nach Reinjektion des Serums* feststellen. Bezogen auf die Schultz-Dale-Reaktion waren etwa ein Viertel unserer Tiere gegen Hundeserum sensibilisiert (vgl. Tab. 1).

Abb. 1 zeigt das Frequenzspektrum von Versuch Nr. 7 als Beispiel. Ein Kurvenverlauf gibt jeweils die gemittelte Frequenz von 2 aufeinander folgenden Testen in Prozenten der Ausgangsfrequenzen wieder. Die mittleren Ausgangsfrequenzen betrugen 65, 68,5 und 64,5 Pulse/20 sec. Die erste Reinjektion von Hundeserum (5 ml 1 : 5 verdünnt über 1 min) erfolgte zwischen dem 2. und 3. Test. Der Ausgangsblutdruck vor dem 1. bis 3. Test betrugt 90—100 mm Hg; nach dem 3. Test, der 6 min nach der Seruminjektion begann, stieg der während des Vagusreizes besonders im Bereich von 5—20 Imp./sec wie üblich erniedrigte Blutdruck nicht wieder an und blieb auch nach einer zweiten Injektion von Hundeserum (1 ml unverdünnt) zwischen dem 4. und 5. Test bei 70 mm Hg stehen. Der Reizerfolg war absolut wie relativ zur jeweiligen Ausgangsfrequenz geringer als vor der Serumgabe.

Diskussion

Wir fragen uns, ob die Differenz der Versuchsergebnisse zwischen den Untersuchungen von Heim (1940) und uns möglicherweise rein methodisch bedingt sein könnte. Der wesentlichste methodische Unterschied liegt unseres Erachtens in der Reizung. Auf die geringere Empfindlichkeit unseres Verfahrens gegenüber unbeabsichtigten Verlagerungen der Elektrode am Nerven wurde schon hingewiesen; insbesondere kann bei unserer Methode eine „Verbesserung" der Elektrodenlage nicht zu einer Verstärkung des Reizerfolges führen. Wesentlich erscheint uns auch, daß Heim den Reizerfolg nach kurzfristiger Reizung (Sekunden?) zur Beurteilung heranzog, während wir mit Reizdauern im Bereich von Minuten arbeiteten und die Reizerfolge im steady state verglichen.

In unseren Versuchen erwies sich nur ein Bruchteil der Serum-vorbehandelten Tiere — gemessen am Erfolg der Schultz-Dale-Reaktion — als sensibilisiert. Wir liegen dabei mit unserer geringen Erfolgsrate im Bereich des von Manwaring mit der Blutdruckreaktion als Test an Katzen erzielten Prozentsatzes. Bezüglich unseres Testes am isolierten Darm ist zu bedenken, daß die Sensibilisierung eines Tieres gegen Fremdeiweiß an verschiedenen Organen nicht zur gleichen Zeit und nicht in gleicher Stärke erfolgen muß; insofern ist die Bedeutung unseres Testes eingeschränkt. Heim hat anscheinend keine besondere Kontrolle des Erfolges der Serumvorbehandlung vorgenommen.

Um den zu erwartenden und in einem Falle auch beobachteten starken Blutdruckabfall nach Reinjektion von Antigenserum zu vermeiden, haben wir kleine Serummengen evtl. wiederholt reinjiziert. Wir glauben, daß auch im Falle einer „langsamen Desensibilisierung" die geforderte Verstärkung des Vagusreizerfolges hätte nachweisbar sein müssen, vor allem unter dem Gesichtspunkt, daß nach Heim dieser Effekt im anaphylaktischen Schock für das Geschehen bei allergischen Krankheitszuständen stehen soll.

Das Problem „anaphylaktischer Schock und Narkose" scheint für uns ohne Belang, soweit wir die Untersuchungen von Heim und von uns vergleichen, weil wir das gleiche Narkoticum verwendeten; bezüglich der Schultz-Dale-Reaktion muß es diskutiert werden. Das Narkoticum wurde von uns durch mehrmaliges Wechseln der Badflüssigkeit vor der Antigenzugabe ausgewaschen. Man braucht das „Auswaschen" jedoch gar nicht zu berücksichtigen, da die in vivo in das Darmgewebe gelangten Narkoticummengen nicht ausreichen dürften, um der Schultz-Dale-Reaktion entgegenzuwirken. Elkeles (1928) benötigte am isolierten Meerschweinchendarm Chloralose in Konzentrationen von 0,1%, um die Schultz-Dale-Reaktion zu hemmen. E. Friedberg (1955) untersuchte in der Schultz-Dale-Anordnung Äthylurethan, Phenyläthylbarbitursäure, Procain und Magnesiumchlorid und fand die Narkotica Urethan und Phenyläthylbarbitursäure im gleichen Konzentrationsbereich hemmend wirksam wie Elkeles die Chloralose. Auch der Doryl-, Histamin- und Bariumchlorid-Spasmus wurde bei praktisch den gleichen Konzentrationen beeinträchtigt.

Bei kritischer Berücksichtigung der diskutierten Fragen können wir eine Empfindlichkeitszunahme des Herzens gegenüber Vagusreizen durch das anaphylaktische Geschehen nicht als bewiesen anerkennen.

In diesem Sinne sprechen auch Untersuchungen, die wir am isolierten Vorhofpräparat des Meerschweinchens durchführten. An den Vorhöfen von 12 gegen Hühnereiweiß sensibilisierten Tieren konnten wir keine Zunahme der negativ-inotropen Wirkung von Grenzdosen Azetylcholin nach Zugabe des Antigens feststellen. Zu entsprechenden Ergebnissen kam auch K. Schmidt (1954) am isolierten Meerschweinchendarm. Er beobachtete keine Veränderung der Empfindlichkeit nach Zugabe des antigenen Hühnereiweißes gegenüber Carbaminoylcholin und Nicotin; einen gleichen Befund erhielt er mit Histamin und Bariumchlorid. Der Ganglienblocker Hexamethonium verhinderte erst in einer Konzentration von 8×10^{-3} sicher die Kontraktur nach Antigen zusatz; die Antigen-Antikörperreaktion lief dabei ab, wie die Desensibilisierung der Präparate zeigte.

Summary

Cats were sensitized by repeated injections of dogs serum.

The effect of stimulation of the vagus nerve on heart rate was tested before and after re-injection of dogs serum.

A facilitation of the effect of the vagus stimulation could not be observed.

Literatur

Busse, W., H. Göing, u. L. Lendle: Z. exper. Med. **125**, 274 (1955). — Carr, van de F. R., and O. B. Williams: J. of Immun. **15**, 13 (1928). — Elkeles, A.: Z. Immun.Forsch. **54**, 471 (1928). — Enenkel, H. J.: Dtsch. med. Wschr. **1955**, 155. — Engelhardt, G., u. L. Lendle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 402 (1955). — Erdmann, D., u. H. Mercker: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 563 (1952). — Friedberg, E.: Dissertation Medizin. Fakultät Göttingen 1955. — Gremels, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **179**, 360 (1935). — Heim, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **196**, 51 (1940). — Heim, F.: Klin. Wschr. **1946/47**, 115. — Heilmeyer, L., zit. nach Enenkel. — Herxheimer, H.: Brit. J. Pharmacol. **10**, 160 (1955). — Kyes, P., and E. R. Strauser: J. of Immun. **12**, 419 (1926). — Manwaring, W. H.: Z. Immun.Forsch. **8**, 1 (1910). — Schaefer, H., u. E. Maier Biochem. Z. **319**, 420 (1949). — Schmidt, H., zit. nach Enenkel. — Schmidt, K.: Dissertation Medizin. Fakultät Göttingen 1954. — Stern, P., u. R. Balzer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **199**, 421 (1942).

Dr. U. Hackenberg,
Göttingen, Geiststraße 9, Pharmakologisches Institut

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 265—274 (1955)

Aus dem Max-Planck-Institut für medizinische Forschung,
Institut für Physiologie, Heidelberg

Kreislaufreaktionen im „Milz-Leber-Mechanismus" und nach Nor-Adrenalin*

Von
WERNER MEESMANN und JOHANNES SCHMIER

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. September 1955)

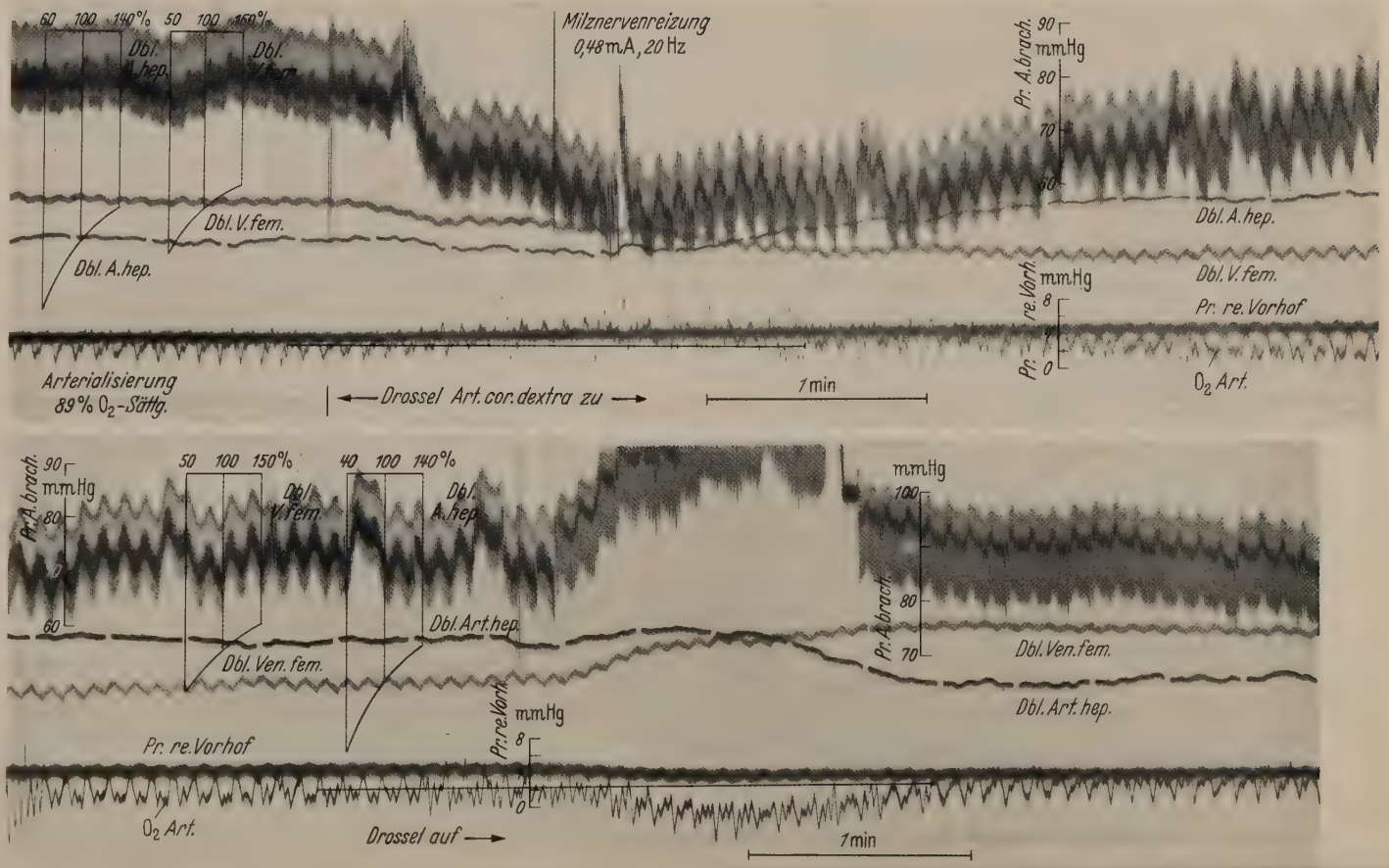
In eingehenden Untersuchungen über die Leber, bzw. das Milz-Leber-System hat REIN (1) deren Bedeutung für den Energiestoffwechsel und die Leistungsfähigkeit des Herzens festgestellt. Durch elektrische Reizung der Milznerven läßt sich der sogenannte „Milz-Leber-Mechanismus" akut und nachhaltig auslösen. Hierdurch wird die Abwehr und Erträglichkeit genereller und lokaler Hypoxien verbessert [REIN (1, 2)]. Besonders wird das hypoxämische Herzversagen, das durch Drosselung der rechten Kranzarterie erzielt wird, günstig beeinflußt [REIN (2)]. Eines der wichtigsten Kriterien dabei ist der Wiederanstieg des Aortendruckes bei noch fortbestehender Herzbelastung. Der arterielle Druck erreicht nach Lösen der Coronardrosselung unter Amplitudenvergrößerung Werte, die z. T. längere Zeit beträchtlich über dem Ausgangsniveau liegen. Die hervorragende Stellung der Leber bei diesen Vorgängen ist dadurch gekennzeichnet, daß dieser Mechanismus nur dann wirksam wird, wenn das Milzvenenblut seinen physiologischen Weg über die Pfortader und damit über die Leber in den Kreislauf nimmt. Nach den Befunden von v. EULER und HOLTZ, wonach Nor-Adrenalin in größeren Mengen aus der Milz freigesetzt werden kann, liegt es nahe, im Nor-Adrenalin das wirksame Prinzip dieses Geschehens zu sehen.

Unsere Untersuchungen sollten klären, ob bei hypoxämischen Herzinsuffizienzen transhepatical injiziertes Nor-Adrenalin (Adrenalin) anders wirkt als die elektrische Reizung der Milznerven. Bei der Bedeutung der Leber für den Milz-Leber-Mechanismus wurde besonders die Durchblutung der Leberarterie beobachtet.

Methodik

Die Versuche wurden an 19 Hunden beiderlei Geschlechts im Gewicht von 19—27 kg durchgeführt. Als Narkosemittel wurde Morphin 0,004 g/kg s.c. und Pernocton 0,03 kg i.m. in mehreren Depots verwandt.

* Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft ausgeführt.


60 100 140% 50 100 150%
Dbl. A.hep.
Dbl. V.fem.
Milznervenreizung
0,48 mA, 20 Hz
Pr. A.brach.
mm Hg
90
80
70
60
Dbl. A.hep.
Dbl. V.fem.
Pr. re.Vorh.
mm Hg
8
0
Pr. re.Vorhof
O2 Art.
Arterialisierung
89% O2-Sättg.
Drossel Art. cor. dextra zu
1 min
50 100 150%
40 100 140%
Dbl. V.fem.
Dbl. A.hep.
Dbl. Art.hep.
Dbl. Ven.fem.
Pr. re.Vorhof
O2 Art.
Drossel auf
100
Dbl. Ven.fem.
Dbl. Art.hep.

Der arterielle Druck wurde in der Arteria brachialis sinistra, der Druck im rechten Vorhof mittels Katheter durch die rechte Vena jugularis mit Wismut-Tauchspulenmanometern bei gedrosselter Amplitude gemessen. Die Durchblutungen einer Vena femoralis und der Arteria hepatica wurden fortlaufend unblutig mit der Diathermie-Thermostromuhr aufgezeichnet. An der Art. carotis sinistra wurde die Arterialisierung fortlaufend mit einem Oxymeter nach Kramer registriert.

Injektionskanülen wurden in Seitenäste einer Mesenterialvene und einer Vena femoralis eingebunden.

Hypoxische Myokardinsuffizienzen wurden erzielt mittels mechanischer Schraubdrossel nach Rein (3) durch Einengung oder Unterbrechung des Blutstroms in der rechten Coronararterie unterhalb ihres Ursprungs aus der Aorta. Näheres über die Operationstechnik siehe Meesmann u. Schmier[1].

Die Präparation der Art. hepatica erfolgte nach Eröffnung der Bauchhöhle durch Medianschnitt unter sorgfältiger Schonung der sie umgebenden Nerven. Das asymmetrische Thermoelement lag an der Art. hepatica communis. Proximal der Meßstelle wurden alle Abgänge dieses Gefäßes, distal die Art. gastro-duodenalis und Art. gastrica dextra, unterbunden. Hierdurch wurde vermieden, daß über arterielle Kommunikationen der Leber Blut zufloß, das an der Meßstelle nicht erfaßt wurde. Näheres über die Anatomie dieser Kommunikationsmöglichkeiten und das dadurch bedingte operative Vorgehen siehe Meesmann u. Schmier (2). — Vom gleichen Schnitt wurden am Milzhilus mehrere Nervenstränge, vor allem der die Hauptarterie begleitende, freigelegt und versenkbare Ludwigsche Reizelektroden angelegt. Die elektrische Reizung erfolgte mit sinusförmigem Wechselstrom, in der Regel mit einer Frequenz von 20 Hz und einer Stromstärke von 0,3 bis 1 mA. Während des Versuches wurden durch versenkbare Guillotinen ohne neuerliche Eröffnung des Bauches die entsprechenden Milznerven nach zentral durchtrennt.

Während der Bauchoperation wurde das Peritonuem durch dauernd warm und feucht gehaltene Mullkompressen vor Wärmeverlusten und Austrocknung geschützt, um bleibende Durchblutungsschäden zu vermeiden.

Die Infusionen erfolgten mit einer gleichmäßig laufenden elektrischen Infusionseinrichtung[1].

Bei geöffnetem Thorax wurden die Tiere mit der Starling-Pumpe mit reinem Sauerstoff oder Gemischen von CO_2 in O_2 beatmet.

Vom Beginn der Narkose wurden die Versuchstiere sorgfältig unter fortlaufender Kontrolle der Rectaltemperatur gegen Wärmeverluste durch einen Lichtbügel und

[1] Für die Herstellung der Infusionsmaschine sowie für sonstige technische Mithilfe danken wir Herrn Feinmechanikermeister Heinemann.

Abb. 1. Auswirkungen einer elektrischen Reizung der Milznerven (20 Hz 0,48 mA für 30 sec) auf den arteriellen Druck und die Durchblutungen in der Arteria hepatica und Vena femoralis bei einer hypoxämischen Myokardinsuffizienz. (Versuch vom 17. 12. 1952, Hund ♂, 18 kg). Offener Thorax, Pumpenbeatmung. Registriert sind von oben nach unten: Arterieller Druck, Durchblutung in der Vena femoralis und in der Arteria hepatica, der rechte Vorhofdruck und die Arterialisierung in der Arteria carotis.

Die Auswirkung der Drosselung der rechten Kranzarterie sind am starken Abfall des arteriellen Druckes und Anstieg des Vorhofdruckes zu erkennen (Vorhofdruck unempfindlich registriert). Dabei Verminderung des venösen Rückflusses in der Vena femoralis, der arterielle Einstrom in die Leber geht kaum zurück. Auf elektrische Reizung der nach zentral durchtrennten Milznerven (für 30 sec) steigt der arterielle Druck anhaltend bis zum Ende der Coronardrosselung. Der Hepaticadurchfluß nimmt beträchtlich zu. Nach Ende der Herzbelastung erfolgt weiterer starker Anstieg des arteriellen Druckes über längere Zeit, die Durchblutungsreaktionen klingen allmählich ab, die Erhöhung des Vorhofdruckes geht zurück

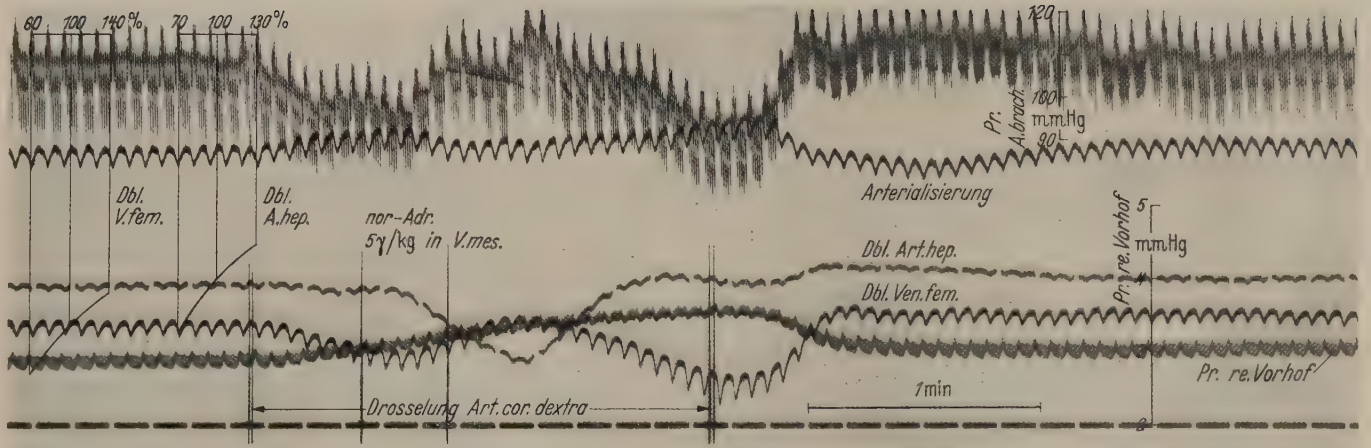


Abb. 2. Folgen einer Nor-Adrenalingabe von 5 γ/kg in die Vena mesenter. Während Drosselung der rechten Coronarateric. (Versuch vom 1. 7. 1953 Hund ♂, 18,5 kg.) Offener Thorax, Pumpenbeatmung. Registrierte Größen wie auf Abb. 1, doch in anderer Reihenfolge von oben nach unten. Drosselwirkung wird erkennbar am Abfall des arteriellen Druckes und Anstieg des Vorhofdruckes sowie am Rückgang der Femoralisdurchblutung. Mit Einsetzen der Nor-Adrenalinwirkung kurzfristiger arterieller Druckanstieg und gleichzeitige Durchblutungsminderung in der Leberarterie. Mit Beginn der Drosselwirkung Rückgang der Femoralisdurchblutung, gleichzeitig mit der Blutdrucksteigerung vorübergehende Durchflußzunahme. Im Gegensatz zur Milznervenreizung der Abb. 1 nur vorübergehende Blutdruckreaktion auf Nor-Adrenalin

heizbaren Operationstisch geschützt. Nach Beendigung der Operation wurde mit dem Beginn der Messung 1—1½ Std gewartet, um nach den Operationsbelastungen eine weitgehend physiologische Reaktionsbereitschaft zu erreichen. Blutgerinnungshemmende Mittel wurden nicht gegeben.

Die Untersuchungen erfolgen in der Zeit von September 1952 bis Februar 1954.

Ergebnisse

Die Abb. 1 bringt ein Beispiel für die Folgen einer elektrischen Milznervenreizung bei hypoxämischer Herzbelastung.

Nach Beginn der Coronardrosselung (Doppellichtzeichen) werden deren Auswirkung auf Herz und Kreislauf sichtbar, wie sie an anderer Stelle ausführlich beschrieben worden sind [Meesmann u. Schmier (1)]: isoliertes, oligämisch bedingtes Myokardversagen des rechten Herzens — das in der Abb. 1 im Anstieg des rechten Vorhofdruckes erkennbar wird (Vorhofdruckregistrierung mit geringer Empfindlichkeit) — secundäres „Versagen“ des linken Herzens infolge verminderten Blutangebotes (Druckabfall auf der arteriellen Seite). Mit Beginn des „Herzversagens“ vermindert sich der venöse Rückfluß in der Vena femoralis deutlich, während der Durchfluß in der Art. hepatica kaum zurückgeht. Dieser Ablauf wird unterbrochen nach der elektrischen Reizung der Milznerven (zwischen den Einzellichtsignalen). Allein aus den Reaktionen des arteriellen Blutdruckes ist auf eine grundlegende Änderung der Gesamtkreislaufsituation zu schließen. Der arterielle Druck steigt bei bestehender Coronardrosselung schon während der Reizung und danach fortlaufend an, bei weiterem, geringfügigen Anstieg des Vorhofdruckes; die Durchblutung der Vena femoralis mindert sich noch geringfügig. Dagegen nimmt der Hepaticadurchfluß beträchtlich zu, während der Blutdruck noch deutlich unter dem Ausgangswert ist. Nach Ende der Herzbelastung durch Lösen der Kranzgefäßdrosselung steigt der Druck im arteriellen System erheblich über sein Ausgangsniveau an und bleibt noch längere Zeit erhöht. (Die Registrierung des Blutdruckes wurde aus kurventechnischen Gründen eingerückt.) Die Steigerung des Vorhofdruckes geht zurück. Die Hepaticamehrdurchblutung klingt allmählich ab, während der Rückfluß in der Femoralvene ohne postoligämische Mehrdurchblutung seine Ausgangsgröße erreicht.

Im Vergleichsversuch der Abb. 2, ebenfalls mit Drosselung der rechten kranzarterie, ist die elektrische Reizung der Milznerven durch eine Nor-Adrenalin-Applikation ersetzt (5 γ/kg in eine Mesenterialvene). Die Drosselung hat bis zu Beginn der Injektion die üblichen Folgen. Hingegen steigt der arterielle Druck nach der Injektion nur kurzfristig an, fällt sogleich wieder und erreicht gegen Ende der Drosselung seinen tiefsten Wert bei ständig steigendem Vorhofdruck. Der Rückfluß in der Vena femoralis nimmt nach der Injektion ebenfalls nur flüchtig zu. Auffallend

Abb. 3. Unterschiedliche Wirkungen des Nor-Adrenalins auf intravenöser transhepaticaler Applikation (Versuch vom 30. 7. 53, Hund ♂, 27 kg) Abgebildet sind: Arteriolisierung in der Arteria carotis, arterieller Systemdruck, Durchblutung in der Arteria hepatica und Vena femoralis, Druck im rechten Vorhof. Zwischen den beiden ersten Lichtmarken Injektion von 0,4 γ/kg Nor-Adrenalin i.v. Blutdruckanstieg und fast ebenso schneller Wiederabfall. Durchblutungszunahme in beiden Gefäßen für die Zeit der Druckerhöhung. Zwischen den beiden Lichtzeichen Injektion der zehnfachen Dosis Nor-Adrenalin in eine Mesenterialvene. Nach transhepaticaler Injektion ist die Blutdrucksteigerung protrahierter, erreicht aber nicht die Werte der vorangehenden Injektion. Rückflußvermehrung in der Vena femoralis, biphasischer Durchblutungsgang in der Arteria hepatica, anfänglich vermindert, dann vermehrt

reagiert die Leberarterie: ihre Durchblutung geht trotz des ansteigenden Blutdruckes zurück. Dann aber erhöht sich der Hepaticadurchfluß noch während der Coronardrosselung und übersteigt den Ruhewert. Nach Ende der Herzbelastung setzt mit dem starken Blutdruckanstieg eine weitere geringfügige Durchblutungszunahme ein.

Nach Freigabe der Kranzgefäßdurchblutung steigt bei fallendem Vorhofdruck der arterielle Druck unter Verkleinerung seiner Amplitude und Zunahme der Herzfrequenz vorübergehend über seine Ausgangslage. Die Femoralisdurchblutung kehrt zu ihrem Ruhewert zurück.

Die Reaktionen auf Nor-Adrenalin und Adrenalin sind abhängig vom Ort der Applikation. In Abb. 3 werden die Folgen von intravenös und über das Pfortadersystem gegebenem Nor-Adrenalin verglichen: a) Nor-Adrenalin (0,4 γ/kg) in eine Vena femoralis: brüsker Blutdruckanstieg mit anschließendem Abfall, gleichzeitig kurzfristige Durchblutungsanstiege in der Art. hepatica und Vena femoralis. Geringfügige vorübergehende Abnahme des Vorhofdruckes mit nachfolgendem kontinuierlichen Anstieg, b) Nor-Adrenalin in 10facher Dosis (4 γ/kg) in eine Mesenterialvene: geringer und flacher Blutdruckanstieg über längere Zeit (Vaguspulse); venöser Rückstrom in der Vena femoralis vermehrt; der Durchfluß in

der Art. hepatica vermindert sich anfänglich stark, überschreitet aber dann seinen Ruhewert.

Grundsätzlich gleiche Reaktionen wurden auf entsprechende Gaben von Adrenalin beobachtet.

Besprechung der Ergebnisse

Ein Vergleich der beiden Versuche der Abb. 1 und 2 macht klar, daß es sich beim „Milz-Leber-Mechanismus" nicht um eine Nor-Adrenalin-Reaktion handeln kann.

Die Folgen der Milznervenreizung bessern deutlich die Leistungsfähigkeit des hypoxämisch geschädigten Herzens. In einem bisher nicht beobachteten Maße steigt der arterielle Druck bei unverändert weiter bestehender Herzbelastung anhaltend und erheblich an; der Rückfluß in der Vena femoralis bleibt vermindert. Das Stromgebiet der Art. hepatica wird im Gegensatz zur übrigen Peripherie dilatiert (kräftige Mehrdurchblutung bei arteriellen Drucken unter dem Ausgangswert!)

Es bleibt offen, ob diese Dilatation nicht bereits als Folge der Coronardrosselung selbst anzusehen ist, da die Durchblutung der Arteria hepatica bei Beginn der Drosselung trotz stark fallenden Druckes nicht abnimmt. Jedenfalls handelt es sich kaum um eine rein kompensatorische Reaktion gegen den erniedrigten arteriellen Blutdruck, da die Durchblutung beträchtlich über den Ausgangswert ansteigt. Selbst wenn man den gleichzeitigen Rückgang in der Durchblutung der Pfortader berücksichtigt [Meesmann u. Schmier (2)] ist die Durchblutungszunahme in der Arteria hepatica größer als zur alleinigen Abdeckung des durch die Minderdurchblutung der Pfortader verringerten O_2-Angebotes an die Leber nötig wäre.

In dem Versuch, der der Abb. 1 zugrunde liegt, könnte außerdem eine stärkere Vasokonstriktion in der Pfortader hervorgerufen werden durch das Nor-Adrenalin, das bei der Milznervenreizung aus der Milz freigesetzt wird.

Möglicherweise könnte aber die Weiterstellung der Art. hepatica nach der Milznervenreizung im Zusammenhang stehen mit dem hierdurch einsetzenden „Milz-Leber-Mechanismus". Dahingehende Vorstellungen wurden von Rein (1) entwickelt und sind an anderer Stelle schon diskutiert worden [Meesmann u. Schmier (2)]. Nach Milznervenreizung ohne zusätzliche Herzbelastung wird die Leberarterie bei gleichzeitiger Einschränkung in der Pfortader nur flüchtig mehrdurchblutet [Rein (1)].

Wesentlich ist das Verhalten des arteriellen Druckes und der Durchblutung in der Vena femoralis. Zu Beginn der Drosselung der rechten Kranzarterie steigt der periphere Widerstand und der Druck im rechten Vorhof [Meesmann-Schmier (1)]. Der Druckanstieg nach der Milznervenreizung könnte zunächst zwei Ursachen haben: weitere Widerstandserhöhung in der Peripherie und vermehrtes Blutangebot zum Herzen. Denn durch Reizung der Milznerven entleeren die Milz und sicherlich auch zum Teil die Leber ein Großteil ihrer Blutvolumina, was zu einer Vermehrung der zirkulierenden Blutmenge führt [Greef (3)]. Beides zumen würde aber eine zusätzliche Belastung bedeuten, die das durch lokale Hypoxämie insuffiziente Herz kaum bewältigen könnte. Der

vorher abfallende Blutdruck steigt aber gerade an, das heißt, *die Leistungsfähigkeit des insuffizienten Herzens nimmt zu*! Das Ausmaß der Drucksteigerung läßt sich kaum anders erklären. Ohne hier auf den Wirkmechanismus einzugehen, sehen wir mit Rein in der Besserung der Leistungsfähigkeit des geschädigten Herzens eine der Auswirkungen des „Milz-Leber-Mechanismus".

Nach dem Ende der Drosselung geht die verminderte Durchblutung der Vena femoralis ohne postoligämische Mehrdurchblutung auf den Ruhewert zurück. Die Minderdurchblutung ist also keine Oligämie, d. h., ein neues Gleichgewicht zwischen Durchblutung und Blutbedarf hatte sich eingestellt. Ursächlich können hierfür Kreislaufregulationen in Frage kommen, die bei dem fallenden Aortendruck infolge primären Herzversagens vom Sinus caroticus und den anderen Pressoreceptoren ausgehen. Eine nervös reflektorische Vasokonstriktion geht mit einer Senkung des oxydativen Gewebsstoffwechsels einher (Literatur bei Bücherl u. Schwab). In dieselbe Richtung weisen auch die Versuche von Rein (4), der bei seinen Coronardrosselungsversuchen eine Minderung des O_2-Verbrauches am Ganztier fand. *Die weitere Einengung der peripheren Durchblutung nach der Milznervenreizung kann aber auch im gleichen Sinn durch Auslösung des „Milz-Leber-Mechanismus" bedingt sein.*

Die Abnahme der Arterialisierung kann mit Rein (3, 4) bei konstanter Pumpenbeatmung im Sinne einer Vermehrung der Lungendurchblutung, d. h. aber eines vermehrten Herz-Zeit-Volumens — und umgekehrt — gedeutet werden, wie wir an anderer Stelle dargelegt haben [Meesmann u. Schmier (2)].

Mag auch bei diesen Reaktionen vermehrt Nor-Adrenalin frei werden und ein Teil der geschilderten Vorgänge darauf zurückzuführen sein, *die Folgen nach Nor-Adrenalin-Gabe sind grundsätzlich andere* (Abb. 2). Nach transhepaticaler Injektion bei Coronardrosselung ist die Leistungsfähigkeit des Herzens nicht in dem Maß gesteigert wie nach Milznervenreizung; insbesondere verläuft die Hepaticadurchblutung entscheidend anders: zuerst starke, ausgeprägte Konstriktion mit erst nachfolgender Dilatation.

Die *primäre Minderdurchblutung in der Arteria hepatica* im Beispiel der Abb. 2 nach Nor-Adrenalin ist wohl auf eine *Vasokonstriktion intrahepatischer Gefäßbezirke* durch direkte Einwirkung zurückzuführen. *Eine solche Vasokonstriktion der Hepatica* ist aber *nach Milznervenreizung*, wenn überhaupt, in diesem Ausmaß von uns *nie beobachtet* worden. Sie ist gelegentlich allenfalls angedeutet vorhanden. Auch die Blutdruckreaktion nach Freigabe der Kranzgefäßdurchblutung weist in Abb. 2 Unterschiede im Vergleich zur Milznervenreizung auf. Bei verkleinerter Amplitude und Zunahme der Herzfrequenz wird das Ausgangsniveau nur vorübergehend überschritten. Nach Abklingen der Myokardhypoxie pumpt das Herz das vor der rechten Kammer gestaute Blut ab. Der Anstieg und Abfall des rechten Vorhofdruckes kann als Ausdruck hierfür angesehen werden.

Die Abweichung des Durchblutungsgangs in der Arteria hepatica nach Nor-Adrenalin- oder Adrenalininjektion über die Pfortader von dem nach Reizung der Milznerven widerspricht der Vorstellung, daß bei dieser

Reizung Nor-Adrenalin und Adrenalin allein der Wirkstoff sein könnten, der in der Leber den sogenannten Milz-Leber-Mechanismus auslöst. Auch andere Unterschiede der Kreislaufwirkungen schließen das aus.

Die Befunde von Gross u. Schneider sind nur mit großem Vorbehalt mit unseren Ergebnissen zu vergleichen, weil die Versuchsbedingungen z. T. wesentlich andere waren. Vor allem wurden von diesen Autoren die Auswirkungen der Milznervenreizung stets nur an Tieren beobachtet, die mit Ausnahme der üblichen Versuchsbeanspruchungen (Operation, Narkose) keinen zusätzlichen Herz- oder Kreislaufbelastungen ausgesetzt waren. Nach unseren Erfahrungen, die mit den Mitteilungen von Rein übereinstimmen, werden aber *die Folgen der Milznervenreizung im Sinne des „Milz-Leber-Mechanismus" erst am insuffizienten und schwerbelastetem Herzen recht deutlich. Die Auswirkungen einer alleinigen Milznervenreizung können sehr verschieden und bei suffizientem Herzen und Kreislauf manchmal sehr wenig charakteristisch* sein. Im übrigen zeigen die Befunde von Gross u. Schneider — vor allem ihre Abb. 5 —, daß *nur* bei Milznervenreizung sich die Durchblutung der Arteria femoralis vermindert, was auf den anderen Abbildungen bei intralienaler Adrenalin- oder Nor-Adrenalin-Verabreichung nicht zu beobachten ist.

Der grundsätzliche Unterschied zwischen den Wirkungen einer Milznervenreizung und einer Nor-Adrenalin- (Adrenalin) Injektion ist weitgehend unabhängig davon, wo das Nor-Adrenalin injiziert wird. Allerdings unterscheiden sich je nach Injektionsort die Reaktionsformen beträchtlich, insbesondere im Hinblick auf den arteriellen Blutdruck und den Durchfluß in der Leberarterie (Abb. 3).

Bei Nor-Adrenalin-Applikation in eine Mesenterialvene ist die zehnfach höhere Dosis notwendig um etwa den gleichen Blutdruckanstieg zu erzielen wie bei peripherer Gabe.

Diese *wesentliche Abschwächung der Wirkung des Nor-Adrenalins und Adrenalins durch die Leberpassage* ist seit längerem bekannt, und wurde erst kürzlich von de Franciscis wieder nachgewiesen. Wenn das Nor-Adrenalin das wirksame Prinzip des „Milz-Leber-Mechanismus" wäre und bei Milznervenreizung alleine aus der Milz freigesetzt würde, so wäre es erstaunlich, daß gerade dieser Stoff in der Leber so stark abgeschwächt wird, bevor er dann am Herzen angreift. Ähnliche Hinweise finden sich schon bei de Franciscis. Es ist anzunehmen, daß die um so vieles höhere Wirkstoffkonzentration bei direkter Gabe über die Leber zu einer Ausschüttung ihres Blutvolumens führt. Das würde die protrahiertere Blutdrucksteigerung und die länger anhaltende Vermehrung des peripheren Rückflusses erklären.

Bemerkenswert ist die geringe Minderung des Druckes im rechten Vorhof zu Beginn des Blutdruckanstiegs nach der peripheren Nor-Adrenalin-Applikation. Dieser Verlauf des Vorhofdruckes wurde nur selten beobachtet, meistens stieg er gleich geringfügig an. Die vorübergehende Senkung kann so verstanden werden, daß durch die positiv intrope Wirkung des Nor-Adrenalins auf das Herz (Gollwitzer-Meyer) kurzfristig mehr Blut abgepumpt wird als nachströmt. Begünstigend für diesen Effekt ist ein leicht erhöhter Venendruck, der auf dem ansteigenden Schenkel des Druck/Volumen-Diagramms der zentralen Venen läge. Schon eine verhältnismäßig geringe Volumenabnahme würde dann verbunden sein mit einem deutlichen Abfall des Druckes. Der im weiteren Verlauf leicht ansteigende Vorhofdruck ist auf die bekannte Vermehrung der zirkulierenden Blutmenge durch Ausschütten der Blutdepots zurückzuführen.

Zusammenfassung

An 19 narkotisierten Hunden werden unter Pumpenbeatmung bei eröffnetem Thorax durch Drosselung oder Verschluß der rechten Coronararterie reversible hypoxische Myokardinsuffizienzen gesetzt. Bei bestehender Herzschädigung löst die elektrische Reizung der Milznerven einen Mechanismus aus, der zu einem Wiederanstieg des Blutdruckes führt, der dann lang anhaltend erhöht bleibt. Gleich nach der Milznervenreizung setzt bei noch vermindertem arteriellen Druck eine ausgeprägte Mehrdurchblutung in der Arteria hepatica ein.

Der Durchblutungsgang in der Leberarterie nach transhepaticaler Gabe von Nor-Adrenalin weicht stets davon ab. Z. B. ist die Blutdrucksteigerung nach transhepaticaler und intravenöser Applikation von Nor-Adrenalin kurzfristig und unterscheidet sich dadurch wesentlich von den Auswirkungen der Milznervenreizung.

Es wird dargelegt, daß *für die Besserung einer hypoxischen Herzinsuffizienz bei den Auswirkungen einer elektrischen Reizung der Milznerven („Milz-Leber-Mechanismus" nach* Rein*) ein anderes Prinzip eingreifen muß als Nor-Adrenalin und Adrenalin. Ebensowenig können sie allein der Wirkstoff sein, der in der Leber den sogenannten Milz-Leber-Mechanismus auslöst.*

Literatur

Bücherl, E., u. M. Schwab: Pflügers Arch. **254**, 337 (1952). — Euler, U. S. v.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **19**, 207 (1949). — Fransciscis, P. de: Pflügers Arch. **258**, 452 (1954). — Gollwitzer-Meyer, Kl., u. E. Witzleb: Pflügers Arch. **255**, 469 (1952). — Greef, K., J. Koch, W. Plewa u. R. Thauer: Pflügers Arch. **259**, 454 (1954). — Gross, F., u. J. Schneider: Helvet. physiol. Acta **10**, 207 (1952). — Heymanns, C., J. J. Bouchaert, S. Faber and F. Y. Hsu: Amer. J. Physiol. **117**, 619 (1936). — Holtz, P.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **20**, 354 (1950). — Meesmann, W., u. J. Schmier (1): Pflügers Arch. **261**, 41 (1955). — Meesmann, W., u. J. Schmier (2): Pflügers Arch. (im Druck). — Rein, H., O. Mertens u. E. Bücherl (1): Naturwissenschaften **36**, 233 u. 260 (1949). — Rein, H., u. A. Dohrn (2): Pflügers Arch. **253**, 435 (1951). — Rein, H. (3): Pflügers Arch. **253**, 205 (1951). — Rein, H. (4): Pflügers Arch. **253**, 309 (1951).

Dr. Werner Meesmann und Dr. J. Schmier, Heidelberg,
Max-Planck-Institut f. Med. Forschung, Institut f. Physiologie

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 275—280 (1955)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Erlangen

Der Einfluß intravenöser Dauerinfusionen von Arterenol und Pendiomid auf den Blutzucker, Sauerstoffverbrauch und Blutdruck der Katze

Von

FRITZ HEIM und URSULA SCHLANDT*

(Eingegangen am 11. Oktober 1955)

In einer früheren Arbeit wurde von HEIM u. WAGNER beobachtet, daß unter dem Einfluß einer intravenösen Dauerinfusion des vegetative Ganglien blockierenden Pendiomids Arterenol an der Katze den Blutzucker senkte, während Adrenalin in der üblichen Weise zu starken Blutzuckersteigerungen führte. In dieser Arbeit wird versucht, in den Mechanismus der nach Ganglienblockierung blutzuckersenkenden Wirkung des Arterenols Einblick zu gewinnen. Beziehungen Ganglien blockierender Substanzen zur Blutzuckerregulation ergeben sich auch aus der Beobachtung von LAURENCE und STACEY sowie von SCHACHTER, daß Ganglienblocker die Insulinhypoglykämie verstärken, weil sie eine kompensatorische sympatho-adrenale Erregung verhindern. MORRISON und FARRAR haben als erste nachgewiesen, daß Ganglienblocker auch die Ansprechbarkeit der Zellen des Nebennierenmarks, die als Strukturanaloge der postganglionären sympathischen Nerven angesehen werden können, gegenüber Splanchnicusreizen aufzuheben vermögen.

Methodik

Die Versuche wurden an künstlich beatmeten Katzen durchgeführt, die als Narkoticum 80—90 mg/kg Chloralose mit einem geringen Urethanzusatz intramuskulär erhielten. Die Blutentnahme zur Blutzuckerdoppelbestimmung nach HAGEDORN-JENSEN erfolgte in ½—1stündigen Abständen aus der Art. femor. Der Sauerstoffverbrauch wurde mittels des KROGHschen Spirometers und der arterielle Druck mit einem Quecksilbermanometer laufend gemessen. Zur Vermeidung von Zuckerverlusten durch Glykosurie wurden vor Versuchsbeginn beide Ureteren unterbunden. Die mit Alloxan vorbehandelten Tiere erhielten innerhalb 14 Tagen vor Versuchsbeginn insgesamt 400—600 mg/kg Alloxan, meist zur Hälfte intravenös und intramuskulär. Die Dauerinfusionen erfolgten in die beiden V. femor. Zu den Untersuchungen wurden l-Arterenolhydrochlorid, l-Suprareninhydrochlorid und Pendiomid „Ciba" verwendet. Die Mengenangaben von Arterenol und Adrenalin beziehen sich auf die Basen. In allen Versuchen wurden die Unterschiede

* D 29

zwischen den Blutzuckerdifferenzen der Vor- und Hauptperiode auf ihre Signifikanz durch Berechnung der Wahrscheinlichkeit P der Abweichung t geprüft. P ergibt sich aus t unter Berücksichtigung des Freiheitsgrades $N - 1$. N ist die Zahl der Einzelbeobachtungen, t ist der Quotient aus dem Mittelwert der Unterschiede der Blutzuckerdifferenzen der Vor- und Hauptperioden einer Versuchsreihe und der Standardabweichung dieses Mittelwertes. Als signifikant können in biologischen Versuchen Unterschiede angesehen werden, bei denen $P = 0{,}05$ oder weniger beträgt.

Versuche

Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen wurden in einer Tabelle zusammengestellt. Die Arterenolinfusionen in Versuchsreihe 1, 2, 4 und 5 dauerten 1 Stunde, in 3, 6 und 7 nur eine halbe Stunde. In Versuchsreihe 1 und 2 wurde an nicht vorbehandelten Tieren der Einfluß einer 1stündigen Dauerinfusion von 0,13 γ/kg/min Adrenalin und 0,65 γ/kg/min Arterenol, in Versuchsreihe 3 die Wirkung einer $\frac{1}{2}$stündigen Dauerinfusion von 0,82 γ/kg/min Arterenol auf Blutzucker, Sauerstoffverbrauch und Blutdruck untersucht. Die genannten Arterenolmengen stellen Schwellenwerte zur Erzielung einer auch statistisch gesicherten Blutzuckersteigerung dar. Die Vorperiode der Versuchsreihe 4 zeigt, daß die Dauerinfusion von 0,13 mg/kg/min Pendiomid zum Blutzuckeranstieg führt. Die während der Pendiomid-Dauerinfusion durchgeführte Arterenol-Dauerinfusion ruft eine Senkung der Blutzuckerkonzentration hervor. Sauerstoffverbrauch und Blutdruck werden dagegen durch Arterenol unter Pendiomid stärker erhöht als vorher. Um den Einfluß des Insulins auf den Blutzucker auszuschalten, wurden in Versuchsreihe 5 Untersuchungen an Katzen durchgeführt, die mit Alloxan vorbehandelt worden waren. Die Ausgangswerte des Blutzuckers lagen bei diesen Tieren im Mittel bei 220 mg%. Sie erfuhren durch die Pendiomid-Dauerinfusion eine Steigerung bis auf 296 mg%. An diesen Tieren bewirkte eine Arterenol-Dauerinfusion keine signifikante Änderung der Blutzuckerkonzentration. In Versuchsreihe 6 wurde durch Infusion größerer Traubenzuckermengen Hyperglykämie erzeugt, die durch Dauerinfusion kleiner Glucosemengen auf der erreichten Höhe von etwa 200 mg% gehalten wurde. In Versuchsreihe 7 wurden Blutzuckerwerte, die ungefähr den durch Pendiomid hervorgerufenen entsprachen, durch eine Dauerinfusion von Adrenalin erreicht. Versuchsreihe 6 und 7 der Tabelle zeigen, daß eine durch Traubenzucker- bzw. Adrenalin-Infusion hervorgerufene Hyperglykämie durch Arterenol-Dauerinfusionen nicht signifikant verändert wird.

Besprechung

Die von uns angewandten Arterenoldosen entsprechen Mengen, die nach Versuchen von v. Euler u. Volkow während elektrischer Splanchnicusreizung oder Asphyxie von den Nebennieren der Katze in das Blut

Tabelle 1

Versuchsreihe	Zahl der Versuche	Dauer der Versuchsperioden in min	Vorperiode				Hauptperiode				Nachperiode				P zu den Blutzucker-Differenzen Spalte 5 u. 9
			Blutzucker in mg%	Diff. in mg%	O_2-Verbrauch cm^3/kg/min	Blutdruck in mm Hg	Blutzucker in mg%	Diff. in mg%	O_2-Verbrauch cm^3/kg/min	Blutdruck in mm Hg	Blutzucker in mg%	Diff. in mg%	O_2-Verbrauch cm^3/kg/min	Blutdruck in mm Hg	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
							D. I. 0,13 γ/kg/min Adrenalin								
1	7	60	167—165	— 2	5,7	128	165—222	+ 57	6,0	140	222– 197	– 25	5,7	140	0,01—0,001
							D. I. 0,65 γ/kg/min Arterenol								
2	12	60	165—162	— 3	5,7	132	162– 182	+ 20	5,9	152	182– 175	— 7	5,5	141	0,02
							D. I. 0,82 γ/kg/min Arterenol								
3	7	30	165—163	— 2	7,0	106	163—179	+ 16	7,15	123	179—168	— 11	1,7	102	0,01
			← 4.—6. Stunde einer D. I. 0,13 mg/kg/min Pendiomid →												
							D. I. 0,6 γ/kg/min Arterenol								
4	17	60	230—253	+ 23	5,4	111	253—221	— 32	5,9	143	221—223	+ 2	5,1	123	0,001
Alloxan vorbehandelt			← 2.—4. Stunde einer D. I. 0,16 mg/kg/min Pendiomid →												
							D. I. 0,65 γ/kg/min Arterenol								
5	6	60	297—296	— 1	6,5	87	296—302	+ 6	6,8	106	302—185	— 17	6,4	68	0,3—0,4
			← D. I. 0,9 mg/kg/min Glucose →												
							D. I. 0,82 γ/kg/min Arterenol								
6	6	30	207—198	— 9	6,8	—	198—184	— 14	7,0	—	184—176	— 8	6,8	—	0,3—0,4
			← D. I. 0,13 γ/kg/min Adrenalin →												
							D. I. 0,82 γ/kg/min Arterenol								
7	4	30	218—238	+ 20	6,1	—	238—267	+ 29	6,4	—	267—275	+ 8	6,65	—	0,6

Alle Zahlen in den Spalten 4—15 auch die Mengenangaben von Adrenalin, Arterenol, Pendiomid und Glucose sind Mittelwerte aus der in Spalte 2 angegebenen Anzahl Versuche. Die Spalten 4, 8, 12 geben die Blutzuckerwerte am Beginn und Ende einer Periode, Spalten 6, 12, 14 den mittleren O_2-Verbrauch, Spalten 7, 11, 15 die mittlere Blutdruckhöhe einer Periode wieder.

abgegeben werden. Sie führen zu statistisch gesicherter Erhöhung des Blutzuckers. Aus dem Vergleich der Blutzuckersteigerungen unter Adrenalin- bzw. Arterenol-Dauerinfusionen (Versuchsreihe 1 und 2) ergibt sich rechnerisch für Adrenalin eine etwa 15mal stärkere glykogenolytische Wirkung als für Arterenol. Zu ähnlichem Ergebnis kam Schümann bei subcutaner Injektion beider Stoffe. Die Pendiomid-Dauerinfusion ruft Hyperglykämie hervor, die durch eine direkte glykogenolytische Wirkung auf die Leberzellen erklärt werden muß, weil Bein u. Meier für das Pendiomid eine Reizung der Ganglienzellen des Nebennierenmarks, die für höhere Konzentration des TEA durch Stone u. Mitarb. nachgewiesen werden konnte, ablehnen. Die während der Pendiomid-Dauerinfusion durchgeführte Arterenol-Infusion senkt den Blutzucker und zeigt eine verstärkte Wirkung auf Blutdruck und Sauerstoffverbrauch. Am unbehandelten Tier betrug unter der 1stündigen Dauerinfusion von 0,65 γ/kg/min Arterenol die Zunahme des Sauerstoffverbrauchs 3,5%, des Blutdrucks 15% und des Blutzuckers 12,4%. Die gleichen Arterenolmengen steigern unter Pendiomid den Sauerstoffverbrauch um 9%, den Blutdruck um 29%, der Blutzucker dagegen sinkt um 12,5% ab. Der Sauerstoffmehrbedarf beträgt unter der 1stündigen Arterenol-Dauerinfusion 30 cm^3/kg und entspricht einem Zuckerumsatz von 36 mg/kg. Vorausgesetzt, daß während der Arterenol-Dauerinfusion der glykogenolytische Einfluß des Pendiomids dem der Vorperiode entspricht, ergibt sich für die 1stündige Arterenol-Dauerinfusion ein Zuckerschwund aus dem Blut von 35 mg/kg.

Unter dem Einfluß des Pendiomids scheint der Blutzucker während der Arterenol-Dauerinfusion deshalb abzusinken, weil infolge der Blockierung des sympathoadrenalen Systems der Zuckernachschub aus der Leber fehlt, während gleichzeitig unter dem Einfluß einer, durch die Verbrennungssteigerung angeregten, verstärkten Insulinabgabe, der zur Deckung des Mehrbedarfs benötigte Zucker dem Blut entnommen wird. Diese Erklärung setzt die Annahme voraus, daß Arterenol nicht unmittelbar auf die Leber glykogenolytisch wirkt, sondern entweder die Erhöhung der Arterenolkonzentration im Blut als solche reflektorisch eine kompensatorische Mehrsekretion von Adrenalin erzeugt, oder die durch Arterenol ausgelöste Verbrennungssteigerung für bestimmte Zentren einen adaequaten Reiz darstellt, der über die Nervi splanchnici Adrenalinabgabe aus den Nebennieren, bzw. über sympathische Lebernerven Hyperglykämie hervorruft. Die zentrale Steuerung der Adrenalinabgabe aus den Nebennieren auf dem Wege über die Nervi splanchnici wurde schon durch ältere Untersuchungen (Zuckerstich nach Cl. Bernard) und neuere Beobachtungen von Holtz, Engelhardt, Greef u. Schümann, Engelhardt u. Greef, v. Euler u. Volkow, Brücke, Kaindl u. Mayer, Kaindl u. v. Euler bewiesen. Wichtig sind in diesem Zusammenhang die Beobachtungen von Dunér, daß nach intravenöser Traubenzuckerinfusion bei Katzen die Hormonsekretion des Nebennierenmarks bis auf 7% der Normalwerte absinken kann. Blutzuckeränderungen sind nach Denervierung beider Nebennieren ohne Wirkung auf die Sekretion des Nebennierenmarks. Nach Versuchsergebnissen an gekreuzten Katzen beeinflußt die Blutzuckerhöhe über Chemoreceptoren im Zentralnervensystem die Nebennierensekretion.

Bei der etwa 15—20 mal stärkeren glykogenolytischen Wirkung des Adrenalins würde schon die reflektorische Abgabe von nur 0,03—0,04 γ/kg/min Adrenalin aus beiden Nebennieren für eine Blutzuckersteigerung genügen, die der einer Arterenoldauerinfusion von 0,65 γ/kg/min entspräche.

Die Mitbeteiligung des Insulins an der unter Pendiomid durch Arterenol ausgelösten Blutzuckersenkung ergibt sich aus Versuchsreihe 5. Trotz Pendiomid-Dauerinfusion wurde unter Arterenol der Blutzucker der mit Alloxan vorbehandelten Tiere nicht gesenkt. Die Schädigung durch Alloxan, das die Insulinbildung im Pankreas und den Zuckerverbrauch der Körperzellen hemmt, gleichzeitig aber die Glykogenolyse in der Leber steigert, wirkt den Vorgängen entgegen, die am Normaltier unter Pendiomid und Arterenol zur Blutzuckersenkung führten.

Durch die unter Pendiomid-Dauerinfusion aufgetretene Hyperglykämie ergibt sich eine veränderte Ausgangslage, die vielleicht teilweise die Umkehr der Arterenolwirkung auf den Blutzucker erklären könnte. Deshalb wurden durch Traubenzucker- bzw. Adrenalin-Infusionen Hyperglykämien von 200—240 mg% erzeugt. Bei diesen hohen Ausgangswerten blieb die Arterenol-Dauerinfusion ohne signifikanten Einfluß auf den Blutzucker. Das Ausbleiben einer Blutzuckersteigerung könnte durch die hohen Blutzuckerausgangswerte bedingt sein, das Fehlen einer signifikanten Senkung dagegen beweist, daß die nach Ganglienblockierung unter Arterenol beobachtete Blutzuckersenkung nicht auf die durch Pendiomid verursachte Hyperglykämie, sondern auf deren Ganglien blockierende Wirkung zurückzuführen ist.

Zusammenfassung

1stündige intravenöse Dauerinfusionen von im Mittel 0,65 γ/kg/min Arterenol führen an Katzen zur Zunahme der Blutzuckerkonzentration, des Sauerstoffverbrauchs und des Blutdrucks. Nach Blockierung der vegetativen Ganglien durch Pendiomid, das in den angewandten Mengen Blutzuckersteigerungen verursachte, bewirken die gleichen Arterenoldosen eine höhere Zunahme des Sauerstoffverbrauchs und des Blutdrucks und eine Senkung des Blutzuckers. Diese Blutzuckersenkung tritt nach Vorbehandlung mit Alloxan nicht mehr auf. Hyperglykämie als solche bedingt noch keine Blutzuckersenkung unter Arterenol-Dauerinfusion. Es wird angenommen, daß Arterenolmengen — innerhalb des physiologischen Bereichs — nicht durch direkte Wirkung auf die Leber, sondern reflektorisch über das sympathoadrenale System den Blutzucker steigern.

Literatur

Bein, H., u. R. Meier: Experientia (Basel) **6**, 351 (1950). — Brücke, F., F. Kaindl et H. Mayer: Arch. internat. Pharmacodynamie 88, 407 (1952). — Dunér, H.: Nature (Lond.) **171**, 481 (1953). - Engelhardt, G., u. K. Greef:

Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **220**, 211 (1953). — Euler, U. S. v., u. B. Folkow: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 242 (1953). — Heim, F., u. H. Wagner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 343 (1953). — Holtz, P., A. Engelhardt, K. Greef u. H. J. Schümann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 58 (1952). — Holtz, P., u. H. J. Schümann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 49 (1949). — Kaindl, F., and U. S. v. Euler: Amer. J. Physiol. **166**, 284 (1951). — Laurence, D. R., and R. S. Stacey: Lancet **1951**, 1145. — Morrison, J. L., and C. H. Farrar: Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. **71**, 235 (1949). — Schachter, M.: J. of Physiol. **115**, 206 (1951). — Schümann, H. J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 164 (1949). — Stone, C. A., Entwisle G. and E. R. Lohr: Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. **78**, 358 (1951).

Dr. Fritz Heim, Pharmakol. Institut d. Universität Erlangen

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 281—292 (1955)

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. H. Schaefer)

Über Herz- und Kreislaufwirkung eines Crataegus-Wirkstoffes (Heptaoxyflavanglykosid)

Von
H. Hille, H. Schaefer, H.-J. Teske und K. E. Zipf

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. Juli 1955)

Während die Verwendung von Präparaten aus Crataegus oxyacantha L. in der praktischen Medizin weit verbreitet ist und in vielen Fällen zu einer positiven Beurteilung der Wirkung entsprechender Medikamente führte[12, 25, 26, 38, 39], sind die Ergebnisse experimenteller Untersuchungen sehr wechselnd, was unter anderem daran liegt, daß in fast allen Fällen verschiedene Präparate zur Untersuchung kamen. Die Vielzahl der in Crataegus oxycantha L. enthaltenen Wirkstoffe[4, 5, 6, 8, 13, 14, 17, 18, 24, 27, 28, 29, 37, 46, 47, 48, 49, 50] muß zwangsläufig verschiedene Effekte hervorbringen. Über den prozentualen Gehalt der verwendeten Präparate an Wirkstoffen liegen wenig verwertbare Angaben in der Literatur vor.

Graham[18] beschreibt nach Verwendung galenischer Zubereitungen Atemlähmungen, Bradykardie, Vorhofflattern und Blocks, Blutdrucksenkung, Minderdurchblutung der Coronarien und Lungengefäße. Nach der von Graham beschriebenen Darstellungsmethode enthielten seine Zubereitungen praktisch keine Triterpensäuren. Schimert[35] sowie Schimert u. Blomer[36] sahen bei Injektion von Triterpensäuren dosisunabhängige Durchblutungszunahmen der Coronarien von maximal 60 min Dauer, die allerdings von Dörner u. Kuschke[11] teils als durch Unzulänglichkeiten der Reinschen Thermostromuhr, teils als durch toxische Einwirkungen der untersuchten Substanzen auf das Gefäßsystem bedingt angesehen werden. Semm[40] beobachtete an Meerschweinchen nach alkoholischer Crataeguslösung eine deutliche neg. chrono- und dromotrope Wirkung, im EKG Infarktbilder und ST-Senkungen. Die Dosis letalis lag bei künstlicher Beatmung 3,5fach höher als ohne diese. Bei Vorinfusion von Crataegusextrakt in den Magen der Tiere hätten Steroidlacton-Glykoside (Dig. purpurea, Dig. lanata, Adonis vernalis und Convallaria majalis) anschließend eine Wirkungssteigerung von 30—80% gezeigt. Die Extrakte enthielten 0,867% des unten näher beschriebenen, von uns geprüften Wirkstoffes $R_2(4)$*.

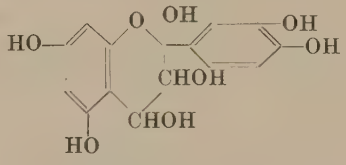
Soweit die vorgenannten Untersuchungen sich auf die Herzwirkung von Crataegus-Wirkstoffen beziehen, ist in der Bewertung der Ergebnisse nicht klar unterschieden zwischen der unmittelbaren Wirkung der Drogeninhaltsstoffe auf den Herzmuskel und mittelbaren Faktoren, die sich nur

* Priv. Mitt. von Prof. Bersin.

indirekt auf den Herzmuskel auswirken. In Vorversuchen* war an unserem Institut festgestellt worden, daß die erste Wirkung von Infusionen eines in Crataegus-Präparaten in relativ hoher Konzentration vorliegenden Flavanglykosides eine Atemlähmung ist. Die daraus folgende Hypoxämie muß selbstverständlich schwere EKG-Veränderungen bewirken. In unseren unten näher beschriebenen Versuchen stellten wir als Ursache dieser Atemlähmung eine starke Blutdrucksenkung fest. Untersuchungen über die Herzwirkung von Crataegus dürfen also nur unter künstlicher Beatmung und gleichzeitiger Kontrolle des Blutdrucks geschehen. Die Abtrennung der mittelbaren von den unmittelbaren Herzwirkungen war wesentlicher Versuchszweck. Zur Analyse der Vorgänge, die der Blutdrucksenkung zugrunde liegen, war das Verhalten der peripheren Strombahn zu untersuchen.

Wir verwendeten eine von Bersin, Müller u. Schwarz[6a] isolierte Reinsubstanz mit der Bezeichnung $R_2(4)$ aus *Crataegus oxyacantha L.*, gelöst in 50%igem Propylenglykol**.

Dieses $R_2(4)$ konnte nach einem neuen Verfahren aus *Crataegus* gewonnen werden. Das standardisierte Crataegus-Präparat „Eurhyton-Hausmann" enthält 1,5% an diesem Wirkstoff. Die chemische Untersuchung ergab, daß $R_2(4)$ die Eigenschaften eines Glykosids besitzt. Das Aglykon gehört zur Klasse der Hepraoxyflavane:



Methodik

I. Wir bestimmten in einer ersten Versuchsreihe an 10 Meerschweinchen die Dosis letalis nach der Methode von Knaffl-Lenz[22, 23] durch Infusion der Substanz $R_2(4)$ in die V. jugularis (10 mg Substanz/cm³ 50%iges Propylenglykol. Infusionsgeschwindigkeit: 1 cm³ in 570 sec). Da sich in Vorversuchen herausgestellt hatte, daß der Herztod erst längere Zeit nach dem Atemstillstand eintritt, legten wir jeweils bei Versuchsbeginn eine Trachealkanüle an, um sofort bei Atemstillstand weiter zu beatmen. Tiergewicht 450—900 g. Narkose: Aethylurethan in 25%iger Lösung, 5 cm³/kg intraperitoneal, mindestens 1 Std vor Versuchsbeginn. Abnahme der 3 Standardextremitätenableitungen mit Nadelelektroden. Registrierung am Elmquist-6fach-EGK-Gerät. Dort auch Registrierung des Blutdrucks, der mit dem Sanborn-Elektromanometer an der durchtrennten A. carotis gemessen wurde. Wegen der Nullpunktinkonstanz dieses Gerätes wurde vor jeder Messung die Nullage erneut geprüft.

---

* Die Vorversuche wurden von K. D. Bock an unserem Institut durchgeführt. Sie sind nicht veröffentlicht.

** Für die Überlassung von Versuchsmengen der Substanz $R_2(4)$ sind wir den Laboratorien Hausmann A. G., St. Gallen/Schweiz zu Dank verpflichtet.

An 3 Meerschweinchen kontrollierten wir die aus der Literatur bekannte Dosis letalis für Digitoxin unter EKG-Kontrolle*.

An 2 Meerschweinchen bestimmten wir die Dosis letalis für das $R_2(4)$-Lösungsmittel Propylenglykol unter Kontrolle des Elektrokardiogramms.

Nachdem wir aus der ersten Versuchsreihe die Dosis letalis für $R_2(4)$ kannten, erhielten 8 Meerschweinchen zu jeweils 100% der zu erwartenden Letaldosis sich ergänzende Gemische von Digitoxin und $R_2(4)$ i.v. infundiert unter EKG- und Blutdruckkontrolle.

Von einer Variation der Infusionsgeschwindigkeit bzw. des Titers der Testlösung, wie sie zur Prüfung von herzwirksamen Substanzen notwendig ist, um Unterschiede in der Geschwindigkeit der Bindung an den Herzmuskel auszugleichen[7, 15, 16, 31, 32, 33, 42, 44, 45, 43, 52, 53], haben wir abgesehen, als sich herausstellte, daß im akuten Versuch keine Herzwirksamkeit der Substanz nachzuweisen war (vgl. Ergebnisse).

II. An 11 Hunden im Gewicht von 18—26 kg registrierten wir in Morphin-Urethan-Chloralose-Narkose fortlaufend bei insgesamt 127 Reaktionen folgende Größen:

1. Den arteriellen Blutdruck mit dem kapazitiven Meßgerät nach Neuhaus, dessen Meßkopfkanüle endständig in einer A. brachialis lag;

2. Die Herzfrequenz mit dem Zeitordinatenschreiber nach Schaefer, Bleicher u. Eckervogt[34], der über einen besonderen Ausgang an das Druckmeßgerät angekoppelt ist;

3. Das Stromvolumen verschiedener Gefäße mit asymmetrischen blutigen Elementen nach Oberdorf[30]. Diese werden, wie noch einmal kurz erwähnt sei, genau wie Reinsche Elemente von einem Hochfrequenzgenerator beheizt. Ihre Lötstellen sind aber so angeordnet, daß es bei Abnahme der Strömungsgeschwindigkeit zu einer Vergrößerung der Temperaturdifferenz kommen muß, ein Temperaturausgleich ist sogar bei eintretender Stase unmöglich. Damit wird also der bei weitgehender Strömungsverlangsamung an den symmetrischen Reinschen Elementen auftretende Pseudoeffekt im Sinne einer Durchströmungszunahme ausgeschaltet. Im einzelnen wurden registriert die Stromvolumina:

a) der A. femoralis bei 6 Hunden,

b) der A. femoralis posterior superior bei 6 Hunden. Durch Farbinjektionskontrollen wurde festgestellt, daß es sich um reine Muskelversorgungsgefäße handelte,

c) der A. saphena bei 5 Hunden. Farbinjektionskontrollen bestätigten, daß es sich um reine Hautgefäße handelte,

d) des R. interventricularis des A. coronaria sin. soweit proximal wie möglich bei 4 Hunden mit blutigen Oberdorfschen Elementen,

e) der A. mesenterica sup. und einer A. renalis bei 3 Hunden.

4. Das Atemvolumen wurde mit dem elektrischen Grundumsatzgerät der Firma Hartmann & Braun bei 4 Hunden, außerdem die O_2-Differenz zwischen Inspirations- und Expirationsluft gemessen. Damit konnte der O_2-Verbrauch errechnet werden.

5. Die Diurese wurde an 3 Hunden beobachtet. Wir führten durch einen Ureter einen Katheter bis ins Nierenbecken. Der Harn wurde über den Katheter und eine Tropfpipette so geleitet, daß der jeweils herabfallende Tropfen einen niedergespannten Gleichstromkreis kurzschließen mußte.

Alle Durchströmungsmessungen wurden mit blutigen Elementen nach Durchtrennung der betreffenden Gefäße ausgeführt.

---

* Die Firma Merck/Darmstadt stellte uns freundlicherweise ihr Präparat Digimerck zur Verfügung.

Als Antikoagulans verwendeten wir bei den Meerschweinchenversuchen 6 mg/kg Vetren i.v., bei den Hundeversuchen das Natriumsalz der Polyaethensulfosäure in der Dosis von 30 mg/kg i.v.*.

Während der Coronarversuche erfolgte bei eröffnetem Thorax künstliche Beatmung. Das Atemvolumen wurde so eingestellt, daß spontane Gegenatmung gerade unterblieb, daß aber ein erhöhter O_2-Bedarf sich durch spontane Respirationsbewegungen erkennbar machen mußte.

Die Injektionen der Testsubstanz erfolgten intraarteriell und intravenös, intraarteriell an den jeweils im einzelnen bezeichneten Stellen, intravenös in die V. brachialis. Injektionszeit 45 sec; die Injektionslösung wurde jedesmal auf 1,5 cm^3 aufgefüllt.

Versuchsergebnisse

Herzwirkung am Meerschweinchen. Wir waren bei der Untersuchung von $R_2(4)$ auf seine Herzmuskelwirkung in der bekannten, mißlichen Lage, daß es im akuten Versuch kein sicheres Indiz für eine derartige Wirkung gibt. Immerhin läßt sich in Analogie zu den elektrokardiographischen Wirkungs- und Vergiftungsbildern von Steroidlactonglykosiden, deren Wirkung anderweitig gesichert ist, einiges aussagen[2, 3, 7, 21, 33, 41, 45, 51]. Als erste Anzeichen einer derartigen Wirkung wären zu erwarten: Ventrikuläre oder Vorhofsextrasystolen, später heterotope Reizbildung, ST-Senkungen usw. Unter $R_2(4)$-Einwirkung dagegen kommt es gemäß Tab. 1 zu einer geringgradigen Abnahme der Reizbildungs- und Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit. Dieser Befund läßt sich aber mit der zunehmenden Hypoxämie erklären, die beim Absinken des Blutdrucks unter dem Einfluß der $R_2(4)$-Infusion eintritt (vgl. unten, Blutdruckwirkung). Eine negativ chronotrope oder dromotrope Wirkung wie sie Semm beobachtete, konnten wir unter ausreichender Beatmung nie sehen. Die vom genannten Autor beschriebene Senkung der ST-Strecke zeigte sich bei uns nur in einem Fall und auch da nur vorübergehend, nämlich am Zeitpunkt des Stillstands der Spontanatmung. Mit hoher Wahrscheinlichkeit lag hier wie bei Semm ein Zustand von Hypoxämie vor, und nach ausreichender Beatmung verschwand die ST-Senkung.

Einfluß von $R_2(4)$ auf Blutdruck und Atmung des Meerschweinchens. Bei Betrachtung der Blutdruckwerte in Tab. 1 fällt das Absinken fast unmittelbar nach Infusionsbeginn auf. Sie sinken kontinuierlich bis zu nicht mehr meßbaren Werten. Vor dem exspiratorischen Atemstillstand sind Werte zwischen 20 und 40 mm Hg erreicht. Es liegt daher nahe anzunehmen, daß der Atemstillstand die Folge des abgesunkenen Blutdrucks ist.

Zahlenmäßige Untersuchungen über die Zusammenhänge von (Cerebral-)Blutdruck und Atmung beim Kaninchen wurden von Bucher[9, 10] durchgeführt. Der von ihm angegebene kritische Druckwert von 30 mm Hg, dessen Unterschreiten zum

* Für die freundliche Überlassung von polyaethensulfosaurem Natrium, mit dem wir gute Erfahrungen machten, sagen wir der wissenschaftlichen Abteilung der Farbwerke Hoechst hiermit unseren Dank.

sofortigen Stopp der Atmung führt, ist bei unseren Versuchstieren in allen Fällen erreicht. Indirekt spricht für diesen Zusammenhang auch die Versuchsreihe mit Kombination von Digitoxin und $R_2(4)$, bei der der Blutdruck nicht nennenswert absinkt. Bei diesen Tieren bleibt der Atemstillstand bei $R_2(4)$-Dosen aus, die bei alleiniger $R_2(4)$-Gabe dazu führten.

Bestimmung der Dosis letalis am Meerschweinchen. Gemäß den oben mitgeteilten Befunden und in Übereinstimmung mit Semm[40] ist die Dosis letalis verschieden anzugeben, je nachdem, ob wir sie mit Spontanatmung

Tabelle 1. *Infusion einer $R_2(4)$-Lösung an Meerschweinchen bis zum Herzstillstand oder Eintritt von Kammerflimmern. 10 mg $R_2(4)$/cm³.*
Lösungsmittel: 50%iges Propylenglykol. Infusionsgeschwindigkeit: 1 cm³ in 570 sec

Gewicht in g	Minuten nach Infusionsbeginn	Dosis$_2$ R (4) in mg/kg	Blutdruck in mm Hg	*RR*-Zeit	*PQ*-Zeit	*QRS*-Zeit	*QT*-Dauer
780 g	—	—	98/82	0,24	0,07	0,02	0,12
	7	9,5	98/82	0,25	0,07	0,02	0,12
	24	32,4	75/60	0,27	0,07	0,02	0,12
	36	48,6	~ 50	0,28	0,08	0,02	0,13
	46	62,2	~ 30	0,28	0,07	0,02	0,13
A. st. st.	49	66,2	< 30				
	52	70,2	< 30	0,28	0,08	0,03	0,13
	64	86,0	< 30	0,32	0,08	0,03	0,14
	79	103,2	< 30	0,29	0,08	0,03	0,14
H. st. st.	94	127,0	0				
810 g	—	—	95/80	0,23	0,07	0,02	0,10
	14	18,3	75/65	0,24	0,07	0,02	0,12
	30	38,8	~ 50	0,27	0,07	0,02	0,13
	42	54,8	~ 35	0,27	0,08	0,02	0,13
A. st. st.	44	57,2	< 30				
	52	67,3	< 30	0,27	0,07	0,02	0,13
	64	83,0	< 20	0,27	0,08	0,02	0,14
	75	97,6	< 20	0,27	0,07	0,02	0,13
	85	105,4	< 20	0,27	0,08	0,02	0,14
	90	117,0	0	0,27	0,09	0,04	0,14
H. st. st.	98	127,0	0				

A. st. st. = Atemstillstand; H. st. st. = Herzstillstand

oder mit künstlicher Beatmung bestimmen. Wir haben beim ersten Aussetzen der Spontanatmung oder beim deutlichen Unregelmäßigwerden derselben die Tiere an die bereitstehende Atempumpe angeschlossen und die bis zu diesem Zeitpunkt infundierte $R_2(4)$-Menge als $DL_{Atemstillstand}$ bezeichnet im Gegensatz zur $DL_{cardialis}$, der infundierten $R_2(4)$-Menge bei Herzstillstand oder Eintritt von Kammerflimmern. Die mittlere $DL_{Atemstillstand}$ beträgt 56,8 mg/kg (43,9—74,8 mg/kg), die mittlere $DL_{cardialis}$ liegt bei 114,3 mg/kg (93,8—152,0 mg/kg). Der Herzstillstand

trat meistens in Diastole ein. Die $DL_{cardialis}$ liegt in unseren Versuchen also etwa doppelt so hoch wie die atemlähmende Dosis, bei Semm 3,5mal so hoch. Dieser Unterschied dürfte damit zu erklären sein, daß wir die Zeit nach dem Aufhören einer geregelten Kammertätigkeit nicht mehr zur Überlebenszeit gerechnet haben, ebenso wie das alleinige Schlagen der Vorhöfe. Bei Semm fehlen genaue Angaben hierüber.

Kontrollinfusionen mit dem Lösungsmittel Propylenglykol. An 2 Tieren wurde die Dosis letalis von 50%igem Propylenglykol bei der sonst auch üblichen Infusionsgeschwindigkeit bestimmt mit 24,0 cm^3/kg (22,2 und 25,8 cm^3/kg). Die durchschnittliche Infusionsmenge bei den $R_2(4)$-Versuchen lag bei 8,0 cm^3/kg, einem Wert, der zwar bei den Kontrolltieren

Tabelle 2. *Kombinierte Infusion von Digitoxin und $R_2(4)$ in sich zu 100% ergänzenden Anteilen der Dosis letalis ($DL_{cardialis}$). Infusionsgeschwindigkeit und Konzentration der Lösungen wurden so eingestellt, daß der Exitus nach 114 min erfolgen mußte, falls es sich um einen reinen Additionseffekt handelte*

Verhältnis Digitoxin/$R_2(4)$ in %	Atemstillstand nach Minuten	Herzstillstand nach Minuten
20%/80%	93	94
20%/80%	108	108
40%/60%	58	64
40%/60%	80	85
60%/40%	95	95
60%/40%	102	102
80%/20%	77	90
80%/20%	92	98

noch keine Schädigung erkennen ließ, der aber doch nicht mit Sicherheit als nicht toxisch zu bezeichnen ist.

Kombinierte Infusion von $R_2(4)$ und Digitoxin. Die kombinierte Infusion von jeweils unterschiedlichen prozentualen Anteilen von $R_2(4)$ und Digitoxin (Digimerck), die sich zusammen zu 100% der $DL_{cardialis}$ ergänzten, führten wir durch, um einen weiteren Hinweis darauf zu bekommen, daß der Wirkungsmechanismus beider Substanzen nicht der gleiche ist, somit $R_2(4)$ im akuten Versuch keine steroidlacton-glykosidartige Wirkung hat. Bei gleichem Wirkungsmechanismus wäre zu erwarten, daß der Exitus letalis erfolgt, wenn 100% des Gemisches infundiert sind. Die von Straub, Triendl u. Bode[43] mit 0,96 mg/kg getestete DL für Digitoxin kontrollierten wir an 3 Tieren, um sicher zu sein, daß es sich bei unseren Tieren nicht etwa um einen Stamm mit stark abweichender Herzglykosidempfindlichkeit handelte; das war nicht der Fall. Bei den anschließend durchgeführten kombinierten Infusionen erreichte kein Tier die zu erwartende Überlebenszeit, die Kombination wirkte also toxischer (vgl. Tab. 2). Das spricht unbedingt für verschiedene Wirkungsmechanismen. Daß verschiedene Hauptangriffspunkte vorliegen, also das

Herz bei den Herzglykosiden und die Kreislaufperipherie bei $R_2(4)$, ist aus diesem Ergebnis weder zu erschließen, noch zu widerlegen. Es wird aber durch die Befunde an der Kreislaufperipherie (vgl. unten) nahegelegt. — Auffällig ist gegenüber reiner $R_2(4)$-Dosierung, daß der Blutdruck bis gegen den definitiven Herztod hin nur mäßig absinkt. Wie schon erwähnt, bleibt damit auch die Atemfunktion ungestört.

Wirkung auf das Stromvolumen von Haut- und Muskelgefäßen bei intraarterieller Injektion. Durch die Registrierung des Stromvolumens der A. fem. post. sup. als reinem Muskelgefäß und der A. saphena als reinem Hautgefäß gelang uns eine saubere Trennung dieser beiden Gefäßgruppen und ihrer Reaktionsformen ohne die sonst notwendigen groben Eingriffe (Unterbindung ganzer Gefäßgruppen, Abschnürung von

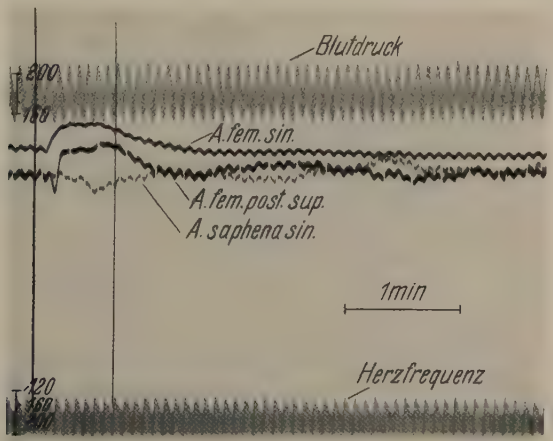


Abb. 1. Injektion von 0,1 mg/kg $R_2(4)$ in die A. femoralis zwischen den beiden Lichtsignalen. Künstliche Beatmung. Registrierung des Stromvolumens der A. femoralis (Bruttovolumen), der A. femoralis post. sup. (Muskelgefäß) und der A. saphena (Hautgefäß)

Extremitätenteilen usw.). Wir injizierten vorwiegend intraarteriell, um die reine Gefäßwirkung zu bekommen ohne Beeinflussung durch zusätzliche Faktoren wie z. B. Blutdruck- und Herzfrequenzänderung. Die intraarteriellen Injektionen erfolgten in die A. femoralis oberhalb der Abgänge des registrierten Haut- und Muskelgefäßes.

Zunächst war die Gefäßwirkung des Lösungsmittels Propylenglykol zu testen. Dosen von 0,5—1,5 cm³/kg der 50%igen Lösung bewirken im Muskelgefäß meistens eine leichte Durchströmungszunahme, in Einzelfällen keine Reaktion, im Hautgefäß eine leichte Abnahme oder keine Reaktion, das Bruttodurchströmungsvolumen (A. femoralis) verhält sich wechselnd. Wir hielten die Lösungsmitteldosis daraufhin in den meisten Fällen zwischen 0,1 und 0,5 cm³ und verdünnten weiter mit physiologischer Kochsalzlösung. Kontrollinjektionen mit gleichen Mengen physiologischer NaCl-Lösung blieben stets wirkungslos.

Die quantitative Auswertung zeigt, daß nach Berücksichtigung der Gefäßwirkung des Lösungsmittels folgende $R_2(4)$-Wirkungen deutlich bleiben:

1. Am Muskelgefäß findet sich in Dosen von 0,1—0,5 mg/kg eine Durchströmungszunahme, die entweder sofort erfolgt oder nach einer wenige Sekunden dauernden kräftigen Abnahme und für 1—1½ min

anhält. Die Wirkungen niedrigerer Dosen lassen sich nicht mehr sicher von den Lösungsmittelwirkungen abgrenzen.

2. Am Hautgefäß tritt bei gleichen Dosen eine Durchblutungsabnahme auf. In einigen Fällen erfolgte keine Reaktion.

3. Das Bruttovolumen (A. femoralis) reagierte unterschiedlich, abhängig von den quantitativen Verhältnissen der Haut- und Muskeldurchblutungsänderungen; meistens resultierte eine Zunahme.

Wirkung auf die Herzkranzgefäße. Bei intraarterieller Injektion in das untersuchte Gefäß variiert die Wirkung in Abhängigkeit von der Dosis: 0,05 mg/kg und weniger waren unwirksam, 0,1 mg/kg wirkten im Sinne einer kräftigen Zunahme, 0,2 (0,3) mg/kg im Sinne einer schwächeren Zu-

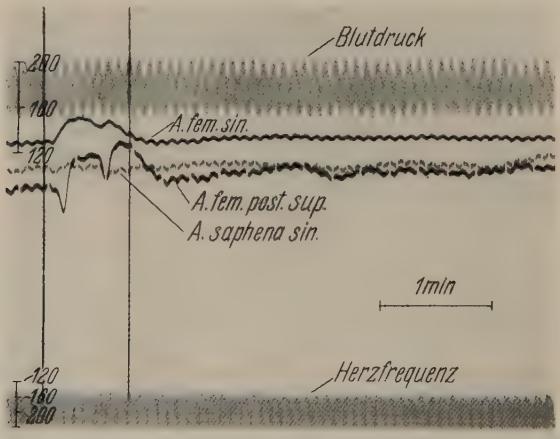


Abb. 2. Injektion von 0,3 mg/kg $R_2(4)$ in die A. femoralis. Übrige Versuchsbedingungen wie bei 1

nahme des Stromvolumens, 0,3 (0,4) mg/kg ließen keine Durchblutungsänderungen erkennen, alle höheren Dosen führten zu dosisabhängiger Abnahme, die z. B. bei 1,0 mg/kg so kräftig und anhaltend sein kann, daß es auch mit anderen Kreislaufmitteln nicht mehr gelingt, eine Mehrdurchblutung des Gefäßes hervorzurufen. Der Blutdruck wurde bei diesen Reaktionen nicht beeinflußt.

Wirkung auf A. renalis, A. mesenterica sup. und Diurese. An der A. renalis beobachteten wir bei niedriger Dosierung (0,1 mg/kg) Durchblutungszunahmen, bei höheren Dosen Abnahmen, an der A. mesenterica nur Abnahmen. Die Diurese wurde nicht beeinflußt. Diese Beobachtung stimmt überein mit Angaben von Bonsmann[8] über das Fehlen eines diuretischen Effekts der Crataegus-Urtinktur bei Mäusen.

Wirkung intravenöser Injektionen auf den Blutdruck, die Herzfrequenz und das Stromvolumen von Haut-, Muskel-, Nieren-, Mesenterial- und Coronargefäßen. Injektionen in die V. brachialis (Dosen bis zu 20 mg/kg) bewirkten, sofern sie die Schwellendosis erreichten, die etwa bei 5 mg/kg

lag, in allen Fällen eine Blutdrucksenkung von ½ bis wenigen Minuten Dauer, die bis auf 60% des Ausgangswertes herabging und in manchen Fällen von einer Erhöhung von wenigen Prozent (immer unter 10%) gefolgt war. Blutdrucksteigerungen ohne primäre Senkung, wie sie Dörner u. Kuschke[11] nach Triterpensäuren sahen, konnten wir bei $R_2(4)$ in keinem Fall beobachten.

Herzfrequenzänderungen treten nur kurzfristig auf, nämlich als vorübergehende Tachycardien während der ebenfalls vorübergehenden Blutdrucksenkungen. Sie sind reflektorisch wohl bedingt.

Im Verhalten des peripheren Stromvolumens ergab sich bei i.v.-Injektion gegenüber i.a.-Injektionen nur insofern ein Unterschied, als bei den Coro-

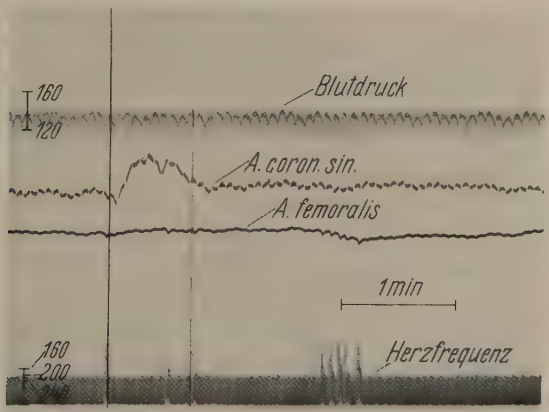


Abb. 3. Injektion von 0,2 mg/kg $R_2(4)$ in die A. coronaria sin. zwischen den beiden Lichtsignalen. Die A. femoralis bleibt unbeeinflußt, da in ihr Stromgebiet keine ausreichende Dosis gelangt. Während der Reaktion einige Extrasystolen, die aber nicht charakteristisch für $R_2(4)$ sind, sondern als Folgeerscheinung der Thoraxeröffnung auftreten

nar-, Mesenterial- und Nierengefäßen blutdruckpassive Durchströmungsänderungen hinzukommen. Außerdem muß natürlich, entsprechend der weiteren Verteilung der Substanz im Gefäßsystem, höher dosiert werden.

Verhalten der Atmung bei i.a.- und i.v.-Injektionen. Kontinuierliche Steigerungen des Atemvolumens auf das 5—6fache des Ausgangswertes zu Versuchsende oder das Einsetzen von zusätzlicher Spontanatmung bei künstlicher Beatmung, wie es Dörner u. Kuschke als Injektionsfolge bei Triterpensäuren beschreiben, haben wir nie beobachtet. Wir haben in 4 Versuchen Messungen des Atemvolumens durchgeführt. Die Steigerungen betrugen + 82% (bei Versuchsende, Ausgangswert = 100%) (insgesamt 35 mg/kg $R_2(4)$), + 56% (12 mg/kg), + 21% (19 mg/kg) und ± 0% (17 mg/kg). Sie erfolgten kontinuierlich, ohne zeitlichen Zusammenhang mit den Injektionen und sind von dem Ausmaß, wie sie

auch sonst gegen Ende eines langdauernden Versuchs vorkommen. Sie lassen keinerlei Rückschlüsse auf eine diesbezügliche $R_2(4)$-Wirkung zu. Von einer mikroskopischen Kontrolle des Lungengewebes haben wir deshalb abgesehen, makroskopisch war kein pathologischer Befund zu erheben.

Besprechung der Ergebnisse

Wenn wir zunächst die Auswirkungen des Heptaoxyflavanglykosids auf den Blutdruck betrachten, so fällt ein Unterschied zu den Befunden von Dörner u. Kuschke mit Triterpensäuren ins Auge. Diese sahen zu Versuchsbeginn überwiegend leichte Blutdrucksteigerungen, gegen Versuchsende überwiegend Senkungen. Wir sahen primäre Steigerungen nie, lediglich einige kurz dauernde Erhöhungen (maximal 10 mm Hg) nach vorheriger kräftiger Senkung. Diese sind wahrscheinlich reflektorisch bedingt. Eine Atemwirkung von $R_2(4)$ sahen wir nur insofern, als hohe Dosen, wie sie bei Infusionen zur Bestimmung der Dosis letalis angewendet werden, als Folge des primären Blutdruckabfalls zur *Atemlähmung* führen. Das ist eine notwendige Folge, die sich durch jede Art von Blutdrucksenkung erreichen läßt. Auch Semm beobachtete dieses Phänomen, erkannte aber seinen sekundären Charakter nicht. Die von Dörner u. Kuschke bei Triterpensäuren beschriebenen *Atemsteigerungen* um einige 100% des Ausgangswertes (4—6 l/2 min zu Versuchsbeginn, bis zu 30 l zu Versuchsende) fanden sich bei $R_2(4)$ nicht. Auch Einsatz von Spontanatmung im zeitlichen Zusammenhang mit der Injektion sahen wir nie.

Dörner u. Kuschke führen den Hauptanteil der von ihnen beobachteten Coronarmehrdurchblutung auf methodische Unzulänglichkeiten der Reinschen Stromuhr zurück; die einsetzende Spontanatmung soll eine Verschiebung der Elementnullinie bewirkt haben. Bei unblutigen Elementen von Typ A ist eine derartige Verschiebung auch leicht möglich. Da in unseren Versuchen keine derartigen Spontanatmungseinsätze eintraten, entfällt diese Fehlerquelle zur Deutung unserer Befunde. Bei direkter Injektion in die Coronarie bleibt für $R_2(4)$ eine Durchblutungszunahme bei niedriger Dosierung, die bei Steigerung der Dosis geringer wird und bei weiterer Steigerung in eine kräftige Abnahme von langer Dauer umschlägt. Die Durchblutungszunahmen dauern in unseren Versuchen bis zu 5 min. Neben diesen aktiven Reaktionen treten bei intravenöser Injektion noch druckpassive Reaktionen auf. Die Durchströmungszunahmen kamen bei gleichbleibender Frequenz zustande.

Die Blutdrucksenkung ist nicht als Wirkung verminderter Herzfrequenz oder verringerten Schlagvolumens zu deuten, sondern muß sich aus dem Verhalten der Kreislaufperipherie ableiten lassen. Die Analyse der $R_2(4)$-Wirkungen ergibt für die Muskelgefäße Durchblutungszunahmen, für Hautgefäße reine Abnahmen oder keinerlei Reaktion; das Bruttovolumen (A. femoralis) nimmt im allgemeinen zu, Bauch- und Nierengefäße

reagieren unterschiedlich. Aus der in hohen Dosen auftretenden Blutdrucksenkung ist zu schließen, daß hier die Mehrzahl der Gefäße nach Art der Muskelgefäße reagiert, also eine Durchströmungszunahme aufweist. Intravenöse Reaktionen wirken im gleichen Sinne.

Als Folge der bei höheren i.v.-Dosen eintretenden Blutdrucksenkung setzt eine Herzfrequenzerhöhung ein, die sicher reflektorisch bedingt ist. Sie klingt bei Normalisierung des Blutdrucks ab. Das Verhalten der peripheren Strombahn erklärt auch die Frequenzwirkung ausreichend. Die von Semm beschriebene negativ chronotrope und dromotrope Wirkung beobachteten wir nicht. Die entsprechenden EKG-Befunde müssen auf Hypoxämie als Folge starken Blutdruckabfalls zurückgeführt werden, ebenfalls die Senkung der ST-Strecken. Alle diese kardialen Effekte lassen sich trotz niedrigen Blutdrucks, wie wir in unseren Meerschweinchenversuchen gezeigt haben, durch kräftige und ausreichende Beatmung weitgehend vermeiden, was bei direkter Herzwirkung ja unmöglich wäre.

Was als Wirkung der von uns untersuchten Crataegussubstanz als gesichert angesehen werden kann, ist eine Eröffnung der peripheren Strombahn, die über eine an anderen Gefäßgebieten auftretende Konstriktion quantitativ überwiegen muß, da es bei höherer Dosierung zum Absinken des Blutdrucks kommt. Die Coronarien reagieren auf kleine Dosen mit Durchblutungszunahme, auf große Dosen mit Abnahme; die Diurese wird nicht beeinflußt; eine direkte Herzwirkung ließ sich im Gegensatz zu Versuchen am isolierten Organ[6a] am Ganztier nicht nachweisen.

Die *therapeutischen* Wirkungen der Substanz auf den Kreislauf werden großenteils peripherer Natur sein. Die Erweiterung der coronaren Strombahn ist mit einer Senkung des peripheren Widerstandes vergesellschaftet. Wie weit das Schlagvolumen bei sinkendem Widerstand, aber zugleich sinkendem Blutdruck steigt, ist aus unseren Versuchen nicht zu entnehmen. Doch arbeitet bekanntlich ein Herz bei sinkenden Widerständen und kleineren Drucken in der Regel ökonomischer als bei hohen Drucken. Diese Ökonomie wird durch die Wirkung auf die Kranzgefäße unterstützt. Wieweit diese Dinge therapeutisch beim Menschen eine Rolle spielen, bleibt noch zu bestimmen.

Zusammenfassung

In Versuchen an Meerschweinchen und Hunden werden die Herz- und Kreislaufwirkungen des in handelsüblichen Crataegus-Präparaten vorkommenden Wirkstoffes Heptaoxyflavanglykosid untersucht. Eine direkte Herzwirkung konnte im akuten Versuch am Ganztier nicht beobachtet werden. Alle im Laufe der Versuche auftretenden Wirkungen auf Herz und Atmung ließen sich aus dem Verhalten der Kreislaufperipherie hinreichend und zwanglos deuten. Durch direkte intraarterielle Injektionen wurde das Verhalten einzelner Gefäßgebiete analysiert.

Die Veränderungen des Stromvolumens der Coronarien waren dosisabhängig, kleine Dosen bewirkten Zunahme, größere Abnahme. Der unter Infusion von Heptaoxyflavanglykosid auftretende Atmungsstillstand ist als bloße Folge des abgesunkenen Blutdrucks zu betrachten.

Literatur

[1] Bauer, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **193**, 661 (1939). — [2] Bauer, H., u. H. Reindell: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **190**, 461 (1938). — [3] Bauer, H., u. H. Reindell: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **191**, 322 (1939). — [4] Bauereis, R.: Angew. Chemie **63**, 487 (1951). — [5] Bersin, Th., u. A. Müller: Helvet. chim. Acta **34**, 1868 (1951). — [6] Bersin, Th., u. A. Müller: Helvet. chim. Acta **35**, 1891 (1952). — [6a] Bersin, Th., A. Müller u. H. Schwarz: Arzneimittel-Forsch. **5**, 490 (1955). — [7] Bircher, R., E. Rothlin u. E. Suter: Helvet. physiol. Acta **5**, 322 (1947). — [8] Bonsmann, M. R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **199**, 384 (1942). — [9] Bucher, K.: Helvet. physiol. Acta **3**, 469 (1945). — [10] Bucher, K.: Helvet. physiol. Acta **4**, 77 (1946). — [11] Dörner, J., u. H. J. Kuschke: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 24 (1955). — [12] Fasshauer, W.: Dtsch. med. Wschr. **1951**, 211. — [13] Fiedler, U.: Naturwissenschaften **40**, 226 (1953). — [14] Fiedler, U.: Arzneimittel-Forsch. **4**, 41 (1954). — [15] Fischer, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **135**, 39 (1928). — [16] Fromherz, K., u. H. P. Bächthold: Helvet. physiol Acta **8**, 454 (1950). — [17] Graham, J. D. P.: Brit. Med. J. (1939) **114**. — [18] Graham, J. D. P.: Quart. J. Pharmacy (London) **13**, 49 (1940). — [19] Harth, V.: Therapiewoche **10**, 560 (1950/51). — [20] Harth, V.: Med. Klin. **1953**, 1551. — [21] Korth, C., u. K. Spang: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **184**, 349 (1937). — [22] Knaffl-Lenz, E.: Amer. J. Pharmacol. **29**, 407 (1926). — [23] Knaffl-Lenz, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **135**, 259 (1928). — [24] Lubitz, F., and J. Fellers: J. Amer. Pharmaceut. Assoc. (Sci. Ed.) **30**, 207 (1941). — [25] Mattausch, F.: Fortschr. Ther. **14**, 315 (1938). — [26] Mezger, P.: Neue med. Welt (Stuttgart) **19**, 14 (1951). — [27] Neu, R.: Naturwissenschaften **40**, 226 (1953). — [28] Neugebauer, H.: Pharmazie **4**, 29 (1949). — [29] Neugebauer, H.: Pharmazie **4**, 284 (1949). — [30] Oberdorf, A., u. O. Wilcke: Z. exper. Med. **124**, 209 (1954). — [31] Reiser, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **195**, 199 (1940). — [32] Rothlin, E.: Pharmaceut. Acta Helvet. **22**, 418 (1947). — [33] Rothlin, E., u. E. Suter: Helvet. physiol. Acta **5**, 298 (1947). — [34] Schaefer, H., E. Bleicher u. F. Eckervogt: Pflügers Arch. **251**, 491 (1949). — [35] Schimert, G.: Z. exper. Med. **113**, 113 (1944); Med. Welt **1950**, Nr. 14. — [36] Schimert, G., u. H. Blomer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 337 (1953). — [37] Schindler, H.: Arch. Pharmaz. **284**, 132 (1951). — [38] Schoeler, H.: Allg. homöopath. Ztg. **195**, 117 (1950). — [39] Seel, H.: Ther. Gegenw. **1949**, 213. — [40] Semm, K.: Arzneimittel-Forsch. **2**, 562 (1952). — [41] Spang, K., u. C. Korth: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **188**, 690 (1938). — [42] Straub, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **198**, 189 (1941). — [43] Straub, W., E. Triendl u. J. Bode: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **199**, 427 (1942). — [44] Straub, W., Z. Kanda u. F. Zinnitz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **194**, 1 (1940). — [45] Suter, E., E. Rothlin u. R. Bircher: Helvet. physiol. Acta **7**, 1 (1949). — [46] Tschesche, F. u. R. Fugmann: Chem. Ber. **84**, 810 (1951). — [47] Ullsperger, R.: Pharmazie, **7**, 211 (1952). — [48] Ullsperger, R.: Pharmazie, **7**, 550 (1952). — [49] Ullsperger, R.: Pharmazie, **6** 141 (1951). — [50] Ullsperger, R.: Pharmazie **8**, 596 (1953). — [51] Walther, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **201**, 611 (1943). — [52] Weese, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **135**, 228 (1928). — [53] Wilbrandt, W.: Helvet. physiol. Acta **10**, 372 (1952).

Prof. Dr. H. Schaefer, Dr. H.-J. Teske, Heidelberg,
Physiologisches Institut der Universität

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 293—299 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. Dr. A. W. Forst)

Beziehungen zwischen mechanischen und chemischen Einwirkungen auf das überlebende Froschherz

Beeinflussung der Farbstoffbindung durch hohe Drucke*

Von
Hans Halbach

(Eingegangen am 9. Juli 1955)

Frühere Untersuchungen hatten ergeben, daß hochfrequenter Wechseldruck am überlebenden Froschherzen Wirkungen hervorruft, welche den durch Gleichdruck (Edwards u. Cattell; Ebbecke) erzielbaren Effekten sehr ähnlich sind (Halbach). Sie bestehen in einer ausgeprägten positiven Inotropie sowie Chronotropie. Weiterhin hatten die kombinierte Anwendung von Calciumionen, Strophanthin und Wechseldruck sowie Vergleiche der Einzelwirkung der vorgenannten Agentien untereinander einen gemeinsamen Angriffsort und ähnlichen Wirkungsmodus derselben wahrscheinlich gemacht. Der den mechanischen und den chemischen Agentien gemeinsame Angriffsort war dementsprechend sowie zufolge der zwischen Gleichdruck- und Wechseldruckwirkung aufgefundenen Parallelen in der Membran zu lokalisieren und im Sinn einer sogenannten Verdichtung derselben zu interpretieren.

Auf der Suche nach einer zur Überprüfung dieser Arbeitshypothese geeigneten Versuchsanordnung bot sich die verhältnismäßig einfache und übersichtliche Methode der Bindung eines Farbstoffs an den in Aktion befindlichen Herzmuskel. Hierbei wurde vorläufig nur von der Vorstellung ausgegangen, ein tertium comparationis in der Wirkung von Digitalisglykosiden einerseits und Druckwirkung andererseits am Froschherzen aufzufinden und zu untersuchen.

Die Bindung von oberflächenaktiven Farbstoffen an den Herzmuskel ist als Modell für die sogenannte selektive Bindung von Digitalisglykosiden an dieses Substrat oft benutzt worden, so u. a. von Führer; Sluyterman (auf Veranlassung von Straub); Hoekstra; Oelssner. Ruppert ging insbesondere der für die vorliegende Problemstellung einschlägigen Frage einer gegenseitigen Beeinflussung der Wirkung von herzwirksamem Glykosid und bindungsfähigem Farbstoff nach; er fand, daß Strophanthin die Bindung von Brillantkongorot (in der Verdünnung 1 : 2000) an das arbeitende Froschherz herabsetzt, und zwar proportional zu der angewandten Konzentration an Strophanthin, welche innerhalb der für das Froschherz „therapeutischen" Größenordnung variiert wurde.

* Herrn Professor Forst zum 65. Geburtstag gewidmet.

Ohne zunächst auf Einzelheiten dieses Befunds einzugehen, sollte in der vorliegenden Studie untersucht werden, ob sich die von Ruppert festgestellte Bindungshemmung des Farbstoffs statt mit Strophanthin auch mit Wechseldruck erzielen ließe, womit gegebenenfalls eine weitere Parallele zwischen membranwirksamen Eigenschaften von Digitalis und mechanischem Druck aufgezeigt wäre.

Versuchsanordnung

Der von Blut befreite Ventrikel 50 bis 60 g schwerer weiblicher Esculenten wird an der aufwärts gebogenen Spitze einer 2 ml fassenden Straubschen Kanüle von 5 mm lichter Weite befestigt und in ein auf 20° konstant gehaltenes Bad von üblicher Ringer-Lösung so tief versenkt, daß er isotonisch gegen den Druck von 20 mm Wassersäule (in Mittellage zwischen systolischer und diastolischer Einstellung) arbeitet und registriert werden kann.

Rhythmische Reizung, über Platinelektroden in der Kanülen- und umgebenden Badflüssigkeit, durch Einzelimpulse von 1 msec Dauer und gleichbleibender Frequenz von 0,5 Hz.

In dieser Anordnung kann der Ventrikel mittels eines Ultraschallerzeugers[1] in ein praktisch homogenes Wechseldruckfeld von 800 KHz und definierter Intensität gebracht werden, die in den Versuchen auf 2 W/cm² am bzw. im Objekt konstant eingestellt wurde.

Als Farbstoff wurde verwandt das Natriumsalz der o-Tolidindisazo-2-naphthylamin-3,6-disulfosäure-2-naphthylamin-6-sulfosäure (genannt Brillantkongorot R) in jeweils frisch bereiteter Lösung von gleichbleibendem Gehalt (1 : 3000) in Ringer-Lösung.

Bestimmung der vom Ventrikel gebundenen Farbstoffmenge durch Differenzbestimmungen der den Ventrikel von der Kanüle aus speisenden Farbstofflösung mittels photoelektrischer Absolutkolorimetrie. Der Quotient aus Abnahme des Farbstoffgehalts während 30 min langen Verweilens im arbeitenden Ventrikel und Gewicht des feuchten, von anhaftender Flüssigkeit oberflächlich befreiten Ventrikels diente als Maß des gebundenen Farbstoffs.

Die Versuche erstreckten sich über die Monate November bis März.

Kritik der Methode

a) Bezüglich der homogenen Durchdringung des Objekts mit Wechseldruck vgl. Halbach.

b) Die für die Farbstoffverbindung in quantitativer Hinsicht maßgebliche Temperaturkonstanz ist in der Versuchsanordnung in nahezu idealer Weise gewährleistet (innerhalb 0,1°).

c) Die Suspension des Ventrikels in Ringer-Lösung ist für den Vorgang der Farbstoffbindung aus der Ventrikelinnenflüssigkeit irrelevant, wie Kontrollversuche mit Suspension in Luft zeigen.

d) Die Spongiosa-Struktur des Froschherzmuskels bewirkt, daß der zeitliche Verlauf und das Ausmaß von Giftwirkungen wie der Farbstoffbindung durch Größe und Frequenz des Kontraktionsvorgangs verändert werden können (Bauereisen). Diese beiden Bedingungen wurden in der

[1] „Ultravibrator" Dr. Lehfeldt u. Co., Heppenheim.

angewandten Versuchsanordnung konstant gehalten: Frequenz 0,5 Hz; Verwertung nur solcher Versuche, in denen die Hubhöhe sich um weniger als 25% während der Versuchsdauer änderte.

Um das Verhältnis von Ventrikeloberfläche, welche vorzüglich die Menge des gebundenen Farbstoffs bestimmt, zu Ventrikelgewicht, auf welches allein die gebundene Farbstoffmenge praktisch bezogen werden kann, möglichst konstant zu halten, wurden nur Tiere der gleichen Größenklasse (50 bis 60 g) verwendet. Die Berechnung für die feuchten sowie trockenen Ventrikelgewichte ergab, daß eine ziemlich konstante Beziehung zwischen Gesamtgewicht des Tieres und dem Gewicht seines Herzens besteht, was nicht so selbstverständlich sein dürfte, daß es im Hinblick auf die Auswertung von Herzgiften am Frosch uninteressant wäre.

e) Beständigkeit des Farbstoffs gegenüber den angewendeten physikalischen und chemischen Einwirkungen:

Licht (in hoher Intensität, unter Einschluß von UV), Sauerstoff sowie Wechseldruck hatten einzeln und in Kombination miteinander während einer Einwirkungszeit von mindestens 30 min praktisch keinen Einfluß auf die Größe der Lichtabsorption einer Lösung von Brillantkongorot *R* in Ringer (gleicher Konzentration wie in den eigentlichen Versuchen), d. h. die durch Licht, Sauerstoff oder Druck allenfalls bewirkten Veränderungen des Farbstoffs lagen innerhalb der Fehlerbreite der Versuchsanordnung.

f) Wie aus dem Vergleich von 25 verschiedenen, täglich neu vorgenommenen Eichmessungen hervorgeht, hat der meßtechnische Teil der Methode einen mittleren Fehler des Mittelwerts von 1 Skalenteil, d. i. weniger als 0,2%.

Versuche

a) Zur *Feststellung der normalen Bindungsfähigkeit* des Froschventrikels für Brillantkongorot *R* wurde die Grenzkonzentration dieses Farbstoffs aufgesucht, welche die Hubhöhe innerhalb 30 min nicht verändert. Sie liegt oberhalb $3{,}3 \times 10^{-4}$. Nach Einfüllung von 2 ml einer Lösung von Brillantkongorot *R* $3{,}3 \times 10^{-4}$ in Kanüle und Ventrikel wird diese Konzentration unter den gegebenen Verhältnissen (Suspension in Ringer-Lösung; 20°; Herzfrequenz 0,5 Hz; 30 min Einwirkungszeit) von 1 mg Ventrikel um 0,33 ($\pm$ 0,01)% vermindert (Tab. 1).

Zur Beurteilung allenfalls vorhandener jahreszeitlicher Schwankungen hinsichtlich der Farbstoffbindung des Herzmuskels wurden 20 solcher Bestimmungen aus den Herbstmonaten mit 20 gleichartigen Bestimmungen aus späten Wintermonaten verglichen. Die statistische Auswertung dieser Gruppen (linke und rechte Kolonne der Tab. 1) zeigt keinen signifikanten Unterschied.

b) Zur *Beurteilung des Einflusses von Wechseldruck* auf die Farbstoffbindungsfähigkeit des Ventrikels mußte Vorkehrung getroffen werden, daß während der Dauer des Versuchs der positiv inotrope sowie chronotrope Effekt des Wechseldrucks nicht zur Auswirkung gelangen und durch

Tabelle 1

Bindung von Brillantkongorot im normal arbeitenden Ventrikel innerhalb 30 min

Vers. Nr.	Diff. Farbstoffkonzentr. mg Ventrikel	Vers. Nr.	Diff. Farbstoffkonzentr. mg Ventrikel
42	0,39	79	0,23
44	0,35	80	0,35
45	0,46	81	0,25
46	0,35	82	0,24
47	0,23	83	0,26
61	0,43	84	0,23
62	0,43	85	0,29
63	0,43	86	0,34
64	0,34	87	0,21
65	0,45	88	0,40
67	0,41	89	0,39
68	0,17	90	0,25
69	0,40	91	0,47
70	0,29	95	0,39
71	0,29	98	0,35
72	0,30	99	0,33
74	0,31	101	0,33
75	0,27	105	0,30
77	0,40	109	0,39
78	0,44	110	0,28

$\overline{m} = 0{,}33$; $\sigma = 0{,}078$; $f_m = 0{,}01$

Veränderung von Kontraktionsgröße und -häufigkeit eine Beeinflussung der Farbstoffbindung vortäuschen konnte. Von den beiden Möglichkeiten, entweder die Wechseldruckenergie unterschwellig zu dosieren oder diejenige Jahreszeit zu wählen, in welcher das Herz erfahrungsgemäß schlechter auf Wechseldruck reagiert, wurde letztere gewählt. Bei Anwendung der verhältnismäßig hohen Wechseldruckintensität von 2 W/cm² (am bzw. im Objekt), welche in der empfindlichen Jahreszeit unter Extrasystolie eine Kontraktur herbeiführen kann (vgl. Halbach), wurde abgewartet, bis eine allenfalls eintretende geringgradige Vergrößerung der Erregbarkeit, d h. Extrasystolie, sowie Zunahme der Kontraktionsgröße wieder verschwanden, was nach wenigen Minuten der Fall war. Dann wurde

Tabelle 2

Bindung von Brillantkongorot unter gleichen Bedingungen wie Tab. 1 mit zusätzlicher Wechseldruckeinwirkung

Vers. Nr.	Diff. Farbstoffkonzentr. mg Ventrikel
102	0,21
103	0,30
104	0,27
106	0,19
107	0,27
108	0,25
111	0,29
113	0,29
115	0,34
116	0,34
117	0,37
118	0,23
119	0,26
120	0,23

$\overline{m} = 0{,}27$; $\sigma = 0{,}052$; $f_m = 0{,}01$

bei ununterbrochener und unverminderter Einwirkung des Wechseldrucks der Kanüleninhalt gegen die Farbstoff-Ringer-Lösung umgetauscht und nach 30 min weiterer Einwirkung von Wechseldruck die Abnahme der Farbstoffkonzentration bestimmt. Sie betrug 0,27 ($\pm$ 0,01)% je Milligramm Ventrikel (Tab. 2).

Umrechnung auf die absolute Menge des gebundenen Farbstoffs ergibt für den normal schlagenden Ventrikel: 2,2 γ/mg Ventrikel; unter Einwirkung von 2 W/cm^2: 1,8 γ/mg Ventrikel.

Die Bindung von Brillantkongorot *R* an den Herzmuskel wird somit durch Wechseldruck von 2 W/cm^2 um 18% herabgesetzt. Der Unterschied ist signifikant ($Q = 3{,}2$). — In beiden Versuchsreihen, ohne und mit Wechseldruck, lagen jeweils zwei Drittel der Einzelabweichungen innerhalb der Dispersion.

Diskussion

Der Befund einer gleichsinnigen Beeinflussung der Bindung von Farbstoff an den Herzmuskel durch Strophanthin und Wechseldruck ist geeignet, die früher abgeleitete Vermutung zu unterstützen, daß hier für das chemische wie für das mechanische Agens gleiche Wirkungsbedingungen im Spiel sind.

Für diese Auffassung spricht ferner das Ergebnis einer überschlägigen Kalkulation der quantitativen Verhältnisse bei der Hemmung der Farbstoffbindung durch Strophanthin und Wechseldruck einerseits und ihrer inotropen Wirkung andererseits. Nach Ruppert wird die innerhalb 30 min vom Herzen aufgenommene Menge von (in der Konzentration 5×10^{-4} angebotenem) Brillantkongorot *R* durch Strophanthin (in einer molaren Konzentration von etwa 5×10^{-7}) um durchschnittlich 40% verringert. Frühere Versuche (Halbach) hatten ergeben, daß Strophanthin in einer molaren Konzentration von 10^{-6} hinsichtlich der inotropen Wirkung am elektrisch gereizten Froschventrikel einer Wechseldruckintensität von etwa 2 W/cm^2 entspricht. In der gleichen Intensität setzt nun der Wechseldruck seinerseits die Farbstoffbindung um etwa 20% herab. Die Konzentrationen von Strophanthin sowie die Beträge der Wechseldruckenergie, welche einerseits eine Kontrakturwirkung entfalten, andererseits die Farbstoffbindung in etwa gleichen Ausmaß verändern, sind also vergleichbar.

Das Versuchsergebnis ist somit ein zusätzliches Argument für die durch einen früher festgestellten Synergismus von Calcium, Strophanthin und Wechseldruck begründete Annahme, daß mechanisches und chemisches Agens eine gleichartige Wirkung, vermutlich an der Membranstruktur, ausüben. Eine weitergehende Deutung der vorgelegten Befunde hat in Betracht zu ziehen a) bekannte Daten der Membranwirksamkeit herzwirksamer Glykoside; b) den Wirkungsmechanismus

hoher mechanischer Drucke; c) den Mechanismus der Farbstoffbindung an den Herzmuskel.

Zu a). Die schon früh aufgestellte Hypothese von der Membranwirksamkeit herzwirksamer Glykoside trat vorübergehend in den Hintergrund zugunsten der Tendenz, ihren Wirkungsmechanismus in einem direkten Eingriff in den Energiestoffwechsel der Herzmuskelzelle zu suchen. Nachdem sich jedoch eine unmittelbare Wirkung der Herzglykoside auf isolierte Fermentsysteme des Betriebsstoffwechsels des Herzmuskels bisher ebensowenig nachweisen ließ wie eine Beeinflussung des kontraktilen Systems, gewinnt ein auf die Zellstruktur gerichteter Wirkungsmodus wieder an Wahrscheinlichkeit (vgl. Reiter u. Barron).

Unter den neueren, diese Auffassung unterbauenden Befunden darf u. a. hingewiesen werden auf:

Die von Trautwein; Trautwein u. Witt beobachtete Normalisierung der durch Chinidin bzw. Calciumentzug gestörten Aktionspotentiale der Herzmuskelfaser, gedeutet im Sinn einer Wiederherstellung der Polarisierbarkeit der Membran bzw. der dieser zugrundeliegenden gestörten Durchlässigkeitsverhältnisse für Ionen; den direkten Nachweis einer Hemmung des aktiven Natrium-Kalium-Austauschs am Erythrocyten durch Schatzmann;

die Kombination von Strophanthin, Digitoxin oder Digoxin mit de- bzw. repolarisierenden Substanzen am quergestreiften Warmblütermuskel, wobei aus dem Synergismus der Depolarisationsstoffe bzw. aus dem Antagonismus der Repolarisationssubstanzen gegenüber den herzwirksamen Glykosiden auf eine Membranwirkung letzterer im Sinn einer Depolarisation geschlossen wurde (Westermann);

die Untersuchungen von Reiter über die Strophanthinwirkung auf Kontraktionskraft und Sauerstoffverbrauch des Rattenherzstreifens, mit dem schlüssigen Hinweis, daß Strophanthin den Ionendurchtritt durch die Membran der Herzmuskelzelle beeinflußt.

Zu b). Der Wirkung hoher mechanischer Drucke auf die lebende Zelle, insbesondere auf Muskel und Nerv, liegt nach Ebbecke eine Viskositätserhöhung der am Aufbau der Zellgrenzschichten beteiligten Lipoid-Eiweiß-Strukturen zugrunde, d. i. eine Membranänderung im Sinn einer Verdichtung. Ebbeckes aus einem reichen Beobachtungsmaterial geschöpfte „Membrantheorie der Druckwirkung" bezieht sich auf Gleichdruck. Durch den Befund gleichartiger Wirkungen von Gleich- und Wechseldruck sowie durch den Nachweis von mit Calcium und Strophanthin synergistischen Wirkungen des hochfrequenten Wechseldrucks am Froschherz (Halbach) ließ sich eine Membranwirksamkeit auch für diese Form des mechanischen Drucks zeigen. Keidel; Keidel u. Kern hatten aus Aktionsstromänderungen an Herz und Nervenfaser vom Frosch auf einen Angriff des hochfrequenten Wechseldrucks an der Membranstruktur geschlossen.

Zu c). Während die unmittelbare Wirkung von Herzglykosiden einerseits und hohem mechanischen Druck andererseits auf Eigenschaften und Funktion der Zellmembran somit sehr wahrscheinlich ist, bestehen über das Wesen der Farbstoffbindung an die Muskelzelle keine gesicherten

Vorstellungen, welche über die theoretische Forderung, daß Brillantkongorot infolge seiner Wasserlöslichkeit als Trisulfonsäure die Lipoidphase meidet, sowie über die Beobachtung seiner großen Bindungsaffinität zu Eiweiß hinausführen. Immerhin ermöglichen diese Daten die Annahme, daß dieser Farbstoff sich in der Lipoid-Eiweiß-Struktur der Membran anreichert und infolge seiner ungleichmäßigen Verteilung in ihren Komponenten ihre Eigenschaften beeinflußt, was wiederum zu der inotropen Wirkung dieses Farbstoffs in Beziehung gesetzt werden kann. Weiterhin bietet die Annahme einer Fixierung des Farbstoffs in der Membranstruktur eine gewisse Erklärung für den Befund, daß diese Fixierung gehemmt wird durch Strophanthin sowie durch hochfrequenten Wechseldruck, welche ihrerseits die Membran in stabilisierendem Sinn verändern.

Die Deutung der Hemmung der Farbstoffbindung an die Herzmuskelzelle durch Strophanthin und Wechseldruck stellt somit als gemeinsamen Wirkungsort beider Agentien die Membranstruktur heraus und bestätigt die Möglichkeit einer im wesentlichen gleichartigen biologischen Wirkung eines mechanischen sowie eines chemischen Agens.

Zusammenfassung

Die Bindung von Brillantkongorot *R* an das schlagende Froschherz wird durch gleichzeitig einwirkenden hochfrequenten Wechseldruck gehemmt.

Der Befund liefert, zusammen mit der bereits bekannten gleichartigen Beeinflussung dieser Farbstoffbindung durch Strophanthin, ein weiteres Argument für die Annahme, daß Strophanthin und Druck — chemisches und mechanisches Agens — die Membranstruktur in ähnlicher Weise verändern können.

Herrn cand. med. O. Gleissner danke ich für seine Mithilfe bei der Durchführung der Versuche.

Literatur

Bauereisen, E.: Z. Biol. **105**, 293 (1952). — Ebbecke, U.: Erg. Physiol. **45**, 34 (1944). — Edwards, J., and McKeen Cattell: J. of Physiol. **84**, 472 (1928). — Führer, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **59**, 161 (1908). — Halbach, H.: Z. Biol. **106**, 124 (1953). — Hoeckstra, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **162**, 663 (1931). — Keidel, W. D.: Pflügers Arch. **252**, 381 (1950). — Keidel, W. D., u. E. Kern: Z. Biol. **104**, 445 (1951). — Oelssner, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 195 (1951). — Reiter, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 315 (1953). — Reiter, M., u. E. S. G. Barron: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 341 (1952). — Ruppert, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **200**, 612 (1943). — Schatzmann, H. J.: Helvet. physiol. Acta **11**, 346 (1953). — Sluyterman, A.: Z. Biol. **57**, 112 (1911). — Trautwein, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 155 (1951). — Trautwein, W., u. P. N. Witt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 197 (1952). — Westermann, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 398 (1954).

Privatdozent Dr. Dr. H. Halbach, Pharmakol. Inst. d. Univ.,
München 15, Nußbaumstr. 28, z. Zt. Genf, WHO

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 300—315 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München
(Direktor: Professor Dr. Dr. A. W. Forst)

Wirkung von Frequenz, Natriumentzug und Strophanthin auf Kontraktionskraft und Alkaligehalt des Herzmuskels*

Von
Melchior Reiter

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. Juli 1955)

Auf Grund früherer Untersuchungen wurde angenommen, daß die Leistungsfähigkeit des Herzmuskels bei ausreichender Energieversorgung von der Fähigkeit der Zellmembranen abhängt, durch Regulation des Kationenaustausches den für die Kontraktionsfähigkeit optimalen intracellulären Gehalt an Natrium und Kalium aufrecht zu erhalten (Reiter 1953 und 1955). Diese Alkaliionen sind neben den zweiwertigen Ionen Ca und Mg für die Muskelkontraktion von besonderer Bedeutung. Sie ermöglichen einerseits durch ihre spezifische intra- und extracelluläre Verteilung den Erregungsablauf (Literaturübersicht bei Fleckenstein), und andererseits hängt von ihrer optimalen Gesamtkonzentration die Verkürzungsbereitschaft des kontraktilen Eiweißes ab (siehe Szent-Györgyi; Weber und Portzehl). Es erschien daher wünschenswert, durch Bestimmung des intracellulären Alkaligehaltes und der Kontraktionskraft des Warmblüterherzmuskels festzustellen, inwieweit eine Beziehung zwischen beiden Größen tatsächlich besteht. Zu diesem Zweck wurde geprüft, wie bekannte kontraktionsverbessernde Maßnahmen, nämlich Frequenzsteigerung, Na-Entzug und der Zusatz von Strophanthin, sich auf die stationären Alkalikonzentrationen im isolierten Herzmuskel auswirken und inwieweit aus den erhobenen Daten auf etwaige Änderungen in der Austauschrate der Ionen geschlossen werden kann.

Methodik

Es wurden Streifen der rechten Ventrikel junger Ratten (Zucht Dr. Behringer München) von etwa 100 g Gewicht verwendet, die in der früher beschriebenen Weise (Reiter 1953) präpariert waren. Die Streifen hatten eine Dicke von 0,5—0,7 mm, sie waren etwa 1,5—2 mm breit. Sie wurden für die isometrische Registrierung zwischen einem dünnen Platinhaken und einer mit dem Hebel verbundenen 1 mm breiten Klemme aufgehängt. Der aktive Querschnitt des Muskels war daher eher kleiner als 0,5 mm^2. Da als Spannungswerte für Einzelzuckungen

* Herrn Professor A. W. Forst zum 65. Geburtstag gewidmet.

des Warmblüterherzens bei 37° C weniger als 2,4 g/mm² angenommen werden (Reichel), liegen die höchsten beobachteten Spannungswerte von 0,8—1,0 g/mm² in der zu erwartenden Größenordnung.

Als Inkubationsmedien standen vier verschiedene Lösungen zur Verfügung (Konzentrationen in m Mol/l):

Tabelle 1

	Normallösung	Na-arm mit Saccharose	Na-arm ohne Saccharose	Verdünnte Normallösung
Na	156,7	88,0	88,0	88,0
K	5,6	5,6	5,6	3,1
Ca	3,2	3,2	3,2	1,8
Cl	169,0	100,0	100,0	94,7
Po_4	1,3	1,3	1,3	1,3
Glucose	5,6	5,6	5,6	5,6
Saccharose	—	131	—	—

Die Medien wurden durch eine Glasfritte mit reinem Sauerstoff durchströmt.

Zur Alkalibestimmung wurden die Streifen nach raschem Eintauchen in dest. Wasser und Abtupfen mit Filtrierpapier in Platintiegel gelegt, in denen sie nach Bestimmung des Feucht- und Trockengewichtes bei 480° C verascht wurden. Die Analyse des Na- und K-Gehaltes erfolgte flammenphotometrisch.

Aus den gemessenen Na- und K-Werten wurden die Konzentrationen im Faserwasser berechnet und dafür ein Intercellulärraum von 17% des Feuchtgewichtes angenommen (gestützt auf Untersuchungen von Kühns). Aus dem Gesamtwassergehalt des Muskels (77,5% beim frisch entnommenen Herzmuskel), dem Intercellulärraum, der Konzentration im Gesamtmuskel (Cm) und der Konzentration in der Außenlösung (Ca) wurde die Konzentration im Faserwasser nach der von Boyle u. Conway angegebenen Formel berechnet:

$$C\,Fw = (C\,m - 0{,}17 \cdot C\,a)/0{,}61$$

Änderungen im Wassergehalt des Muskels wurden im Nenner berücksichtigt. Für die Berechnung der [Na] im Fasserwasser der Ausgangswerte wurde als Na-Außenkonzentration der Na-Gehalt des Rattenserums (145 m Mol/l — Conway — 1945) bei den anderen Werten die [Na] der jeweils verwendeten Lösung zugrunde gelegt. Einen Unsicherheitsfaktor bildet die Unkontrollierbarkeit von Änderungen des Intercellulärraumes im Laufe der Versuche, doch dürften bei geringen Änderungen des Intercellulärraums die Fehler durch Annahme seines konstanten Anteils von 17% am Gesamtvolumen relativ gering sein, größere Änderungen müßten sich im Verhältnis Trockengewicht zu Feuchtgewicht widerspiegeln.

Die Ausgangswerte der Abb. 1 stammen von Muskelproben, die dem rechten Ventrikel der Rattenherzen so schnell wie möglich nach Tötung der Tiere entnommen wurden, ohne daß sie in Salzlösung gespült wurden. Zur Präparation der für die mechanische Registrierung geeigneten Streifen wurden die Herzen in sauerstoffgesättigter „Normallösung" von Zimmertemperatur gelegt, und nach Abtrennung des rechten Ventrikels wurde dieser während der Zeit der Präparation laufend mit Lösung beträufelt. Die Aufhängung des Muskels erfolgte in einem Gefäß mit zunächst zimmerwarmem Medium, das nach Eintauchen des Gefäßes in den Thermostaten rasch dessen Temperatur von 37° C annahm (die Temperatur betrug nach 1 min 33,5 und nach 3 min 37° C). Zur Zeit der Präparation der Streifen hatte der K-Gehalt bereits ab- und der Na-Gehalt zugenommen. Diese Diffusion entsprechend den Konzentrationsgradienten hielt bei weiterem Aufenthalt der Streifen

in der Lösung bei 20° C an, und entsprach zum Zeitpunkt der Inkubation im Thermostaten etwa den in Abb. 1, 5 und 6b vor der Nullgrenze angegebenen extremen Werten. Da der Temperaturausgleich im Untersuchungsgefäß nur 3 min dauerte, ist anzunehmen, daß sehr bald nach Einbringung in den Thermostaten die durch die Temperatursteigerung bedingte Stoffwechselerhöhung den gegenläufigen Prozeß der Kaliumakkumulierung und der Natriumelimination in Gang setzte.

Die in den Kurven angegebenen Werte sind Mittelwerte von 6—22, im Durchschnitt von 10 Einzeluntersuchungen. Es wurde in jedem Fall darauf geachtet, daß die Streuung von zweidrittel der Einzelwerte die mittlere Abweichung vom Mittelwert nicht überstieg.

I. Einfluß der Frequenz auf den Alkaligehalt und die Kontraktionskraft der Herzmuskelstreifen

Das frisch entnommene Gewebe des rechten Rattenventrikels hat einen K-Gehalt von 138,5 m Mol/l Faserwasser und einen Na-Gehalt von 19,5 m Mol/l Fw., demnach einen Summenwert Na + K von 158 m Mol/l Fw. Lowry gab für das Gesamtherz der Ratte Werte von 131 für K und 13 m Mol/l Fw. für Na an und Kühns 133 bzw. 28,6 m Mol/l Fw. Inkubiert man die Streifen des rechten Rattenventrikels in sauerstoffgesättigter isotoner Salzlösung, so nimmt ihr Gehalt an K ab, während ihr Natriumgehalt zunimmt. Wie aus Abb. 1 ersichtlich, übersteigt beim nicht gereizten Herzstreifen nach einer Inkubationszeit von 75 min die Zunahme des Na die K-Abgabe um 19 m Mol/l Fw., dementsprechend steigt der Gesamtwert Na + K von 158 auf 177 m Mol/l Fw. an.

Es bestehen ähnliche Verhältnisse, wenn die Ventrikelstreifen in isometrischer Anordnung mit einer Frequenz 1/sec gereizt werden (Reiter, 1955). Während bei der Präparation der Streifen in Salzlösung von Zimmertemperatur ein ziemlich rascher Austausch von K und Na entsprechend den Konzentrationsgradienten in etwa äquimolaren Mengen stattfindet, erfolgt nach der Inkubation zunächst eine Rückresorption von K, deren Höhepunkt nach 30 min erreicht ist. Gleichzeitig wird auch, wie aus dem Gang der 15 und 30 min Werte der [Na] in Abb. 1 hervorgeht, Natrium eliminiert, doch um 16 m Mol/l Fw. weniger, als Kalium aufgenommen wird. Das führt zu einer Erhöhung des Gesamtalkaligehaltes auf 174 m Mol/l Fw., als deren Ursache eine Insufficienz der Zellen, Natrium aktiv zu eliminieren, angenommen werden muß. Die nach 30 min Inkubation einsetzende Abnahme der intracellulären [K] und die sich im gleichen Ausmaß haltende weitere Zunahme der [Na] könnte allein auf einer zunehmenden Schädigung der Natriumpumpe beruhen, wenn man annimmt, daß das Fassungsvermögen der Zellen für Alkaliionen erreicht und ein weiteres Ansteigen der [Na] einen Austausch gegen K zwangsläufig zur Folge hätte. Doch sprechen die Ergebnisse bei der zehnfachen Reizfrequenz dafür, daß auch die Fähigkeit zur

Kaliumrückresorption mit zunehmender Inkubationszeit geringer wird. Der Wassergehalt des Gewebes ändert sich während der Inkubation kaum, das Trockengewicht variierte während der 120 min dauernden Reizperiode zwischen 22,5% und 23,2%.

Die Kontraktionsstärke bleibt bei der Frequenz 1/sec, wie die Abb. 2a zeigt, während der ersten 30 min gleich, um dann später langsam aber stetig abzunehmen. Diese Abnahme der Kontraktionskraft ist relativ gering verglichen mit dem Unterschied zwischen der Kontraktionsstärke nach inotrop wirkenden Maßnahmen und den Ausgangsamplituden bei der Frequenz 1/sec in „Normallösung" (Abb. 2a, 3, 4 und 6a). Wenn also zwischen Kontraktionsstärke und intracellulärem Ionenmilieu des Muskels eine Beziehung besteht, so ist der nach 30 min Inkubation einsetzende Austausch in der stationären Konzentration von Natrium und Kalium von geringerer Bedeutung als die zu Beginn der Inkubation durch mangelhafte Natrium-Elimination bewirkte Erhöhung der Gesamtkonzentration Na + K.

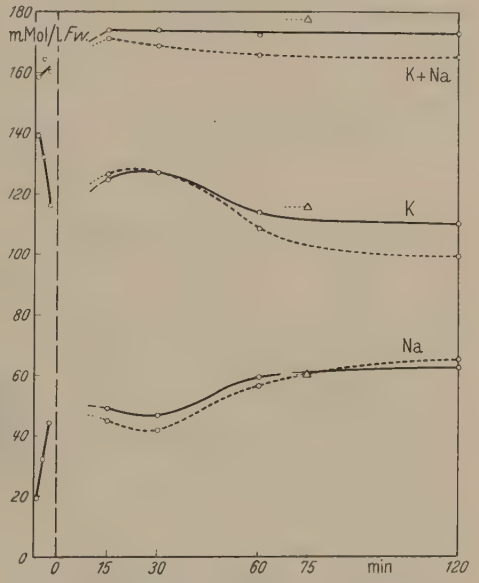


Abb. 1. Abhängigkeit des Alkaligehaltes in Normallösung inkubierter Herzmuskelstreifen von der Frequenz. △ ····· nicht gereizt; o——— o 1/sec; o- - - - - o 10/sec

Über Veränderungen in der Elektrolytzusammensetzung des insuffizienten Herzens ist schon früher von verschiedenen Autoren berichtet worden. Malorny u. Netter beobachteten eine Zunahme von Na im ermüdeten Warmblüter-Herzmuskel und Kaunitz eine Abnahme des K-Gehaltes. Bammer u. Rothschuh fanden, daß auch in Ringer-Lösung inkubierte Herzstreifen des Frosches K verlieren. Die gleichen Veränderungen fanden Clarke u. Mosher in Herzen von Menschen, die an Herzinsuffizienz gestorben waren. Aus diesen Angaben läßt sich jedoch nicht ersehen, ob und inwieweit die Gesamtkonzentration der beiden Kationen sich veränderte. Dagegen ergibt die Berechnung der von Holland, Greig u. Dunn an isolierten Meerschweinchenvorhöfen erhaltenen Werte ebenfalls eine Erhöhung der Gesamtkonzentration an Na + K im Faserwasser 25 min nach Inkubation in Locke-Lösung bei 37° C.

Bei der Reizfrequenz 10/sec — dies liegt bei 100 g schweren Ratten in vivo noch im normalen Bereich (Müller) — ist die Kontraktionskraft zu Beginn der Reizung wesentlich größer (Abb. 2a). Die Amplitudenhöhe nimmt aber sehr rasch ab, sie kommt nach 15 min auf den bei

der niedrigen Reizfrequenz erst nach 120 min erreichten Wert und behält diesen während der ganzen Beobachtungszeit bei. Gleichzeitig mit der Abnahme der Amplitudenhöhe entwickelt sich eine Zunahme der Grundspannung. Beide Phänomene wurden am Rattenherzstreifen in Abhängigkeit von der Reizfrequenz bereits von Sutherland et. al. und am Papillarmuskel der Katze von Trautwein u. Dudel beschrieben. Schaltet man während der Reizung kurz auf die niedrige Frequenz

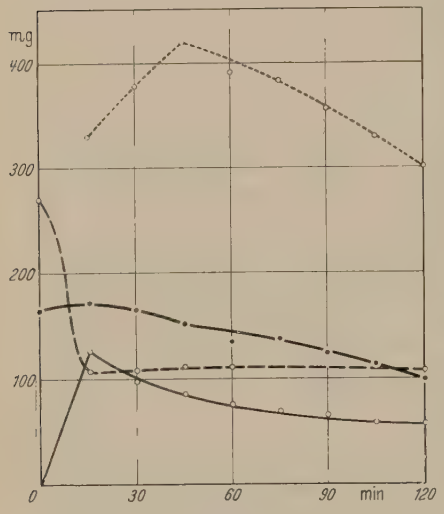


Abb. 2a

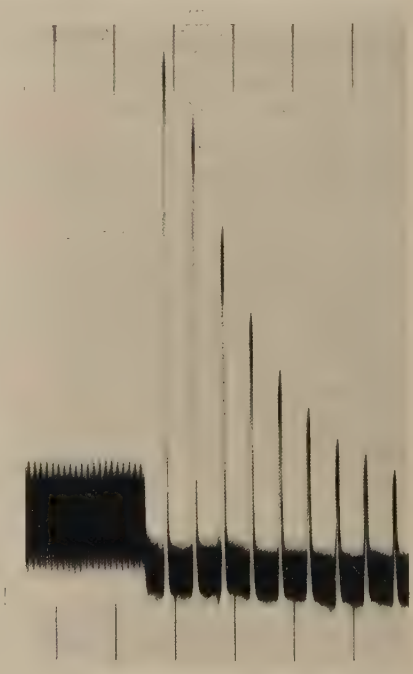


Abb. 2b

Abb. 2a. Kontraktionskraft von Herzmuskelstreifen in Normallösung in Abhängigkeit von der Frequenz- •———• 1/sec; o———o 10/sec; o- - - - -o Aplitudenhöhe nach Umschalten von 10/sec auf 1/sec; o———o Zunahme der Grundspannung bei 10/sec

Abb. 2b. Absteigende Treppe nach Umschalten von der Reizfrequenz 10/sec auf 1/sec. Zeitmarke: 2/sec

(1/sec) zurück, so sind die ersten Amplituden um mehrere 100% größer als bei der hohen Frequenz (Abb. 2a und 2b).

Diese Erscheinung wurde schon an verschiedenen Herzpräparationen beschrieben (Hajdu, Szent-Györgyi, Trautwein u. Dudel, Furchgott u. Sleator, Lee). Man kann sie rein phänomenologisch am besten mit der Annahme zu deuten versuchen, daß der Muskel durch die hohe Reizfrequenz in eine für die Kontraktion verbesserte Situation gebracht wird und daß dieser kontraktionsfördernde Effekt mit zunehmender Reizdauer durch einen an die Frequenz gekoppelten Ermüdungsfaktor überdeckt wird, der beim Umschalten auf niedrige Frequenz sofort wegfällt (Trautwein u. Dudel). Hajdu und Szent-Györgyi erklärten den Frequenzeffekt auf die Kontraktionsstärke des Froschherzens durch die Annahme einer bei hoher Frequenz erfolgenden Verminderung der intracellulären Gesamtionenkonzentration, die durch eine vermehrte Kaliumabgabe erfolgen soll. Dies setzt voraus,

daß die Kaliumabgabe nicht durch eine äquivalente Natriumaufnahme kompensiert wird.

Die Bestimmung der stationären intracellulären Alkalikonzentrationen der Rattenherzstreifen bei der Reizfrequenz 10/sec ergibt (Abb. 1), daß die Gesamtkonzentration Na + K mit zunehmender Reizdauer bis zur 60. Minute abnimmt und von da ab konstant bleibt. Die Verminderung kommt in der ersten Reizperiode nicht durch eine Abnahme der [K], sondern durch eine Abnahme der Natriumkonzentration zustande. Entsprechend den oben angeführten Überlegungen muß man daraus schließen, daß die Fähigkeit des Muskels zur Kaliumrückresorption während der ersten 30 min auch bei der zehnfachen Reizfrequenz ausreichend ist, um eine Abnahme des Kaliumgehaltes zu verhindern. Die niedrigeren Natriumwerte sprechen dafür, daß die Natriumelimination zu Beginn der hohen Reizfrequenz (durch erhöhten Stoffwechsel?) verbessert ist.

Anders liegen die Verhältnisse bei längerer Reizdauer. Die Kaliumkonzentrationen der 10/sec gereizten Muskeln liegen nach 60 und 120 min um einen signifikanten Betrag von 7 bzw. 8 m Mol/l Fw. niedriger als die der 1/sec gereizten Muskeln, während die Natriumkonzentrationen sich von den Kontrollwerten nicht wesentlich unterscheiden[1]. Hier übersteigt also die entsprechend der hohen Reizfrequenz vermehrte Kaliumabgabe das Vermögen des Muskels zur Rückresorption. Ob das Ausbleiben einer die Kaliumabgabe ausgleichenden Natriumaufnahme allein auf die im ersten Reizstadium beobachtete und etwa noch anhaltende verstärkte Natriumelimination bezogen werden darf, läßt sich nicht entscheiden.

Zeigt sich nach den beschriebenen Versuchsdaten die Einwirkung einer hohen Reizfrequenz auf die intracelluläre Kalium- und Natriumkonzentration entsprechend der Inkubationsdauer des gereizten Muskels völlig verschieden, so ist die Auswirkung auf die Gesamtkonzentration Na + K doch von Anfang an gleich. Es liegt daher nahe, in der Abnahme der intracellulären Alkalikonzentration die Ursache für die kontraktionsverbessernde Wirkung der hohen Reizfrequenz zu sehen, die sofort nach dem Umschalten auf niedrige Frequenz und dem damit bedingten Fortfall des an die hohe Frequenz gekoppelten „Ermüdungsfaktors" offenbar wird. Daß diese Wirkung bei niedriger Frequenz nicht lange anhält, ist nach den dargelegten Überlegungen verständlich, denn

[1] *Anmerkung bei der Korrektur:* Während der Drucklegung erschien eine Arbeit von Hercus, V. M., R. J. S. McDowall and D. Mendel: J. Physiol. **129**, 177 (1955) über "Sodium exchanges in cardiac muscle". Die Autoren berichten über eine Abnahme der cellulären [K] von Rattenherzstreifen um 20 m Mol/l Fw bei annähernd unverändertem Natriumgehalt nach Erhöhung der Reizfrequenz von 12 auf 100 pro Minute. Die Temperatur betrug 33° C; die Dauer der Reizung geht aus den Angaben nicht hervor.

es fällt mit der hohen Reizfrequenz sowohl die Ursache für das Mißverhältnis zwischen Kaliumabgabe und Vermögen des Muskels zur K-Rückresorption fort wie auch eine an die hohe Reizfrequenz gebundene Stimulierung der Natriumpumpe. In jedem Fall muß es wieder zu einem Ansteigen der intracellulären Gesamtkonzentration Na + K kommen.

Im Moment der Herausnahme der Muskelstreifen aus dem Medium wird entsprechend den Konzentrationsgradienten ein fortschreitender Austausch zwischen Intra- und Extracellulärflüssigkeit einsetzen. Trotzdem ist man berechtigt, aus den gemessenen Werten die intracelluläre Alkalikonzentration unter Annahme der gleichen Alkaliverteilung in Extracellulärflüssigkeit und Außenmedium zu berechnen und diesen Wert auf den Zeitpunkt der Herausnahme des Muskels zu beziehen, da von diesem Augenblick an kein Austausch zwischen Extracellulärflüssigkeit und Außenmedium mehr stattfinden kann. Setzt man die so gemessene intracelluläre Alkalikonzentration in Beziehung zur Kontraktionskraft des Muskels, so entsprechen die bei hoher Reizfrequenz gewonnenen Alkaliwerte den ersten kräftigen Kontraktionen nach Umschaltung auf niedrige Frequenz (Abb. 2b) und nicht den schwachen Kontraktionen am Ende der „absteigenden Treppe". Wollte man die celluläre Alkalikonzentration zu diesem Zeitpunkt bestimmen, so müßte man nach dem Umschalten bis zur Herausnahme des Muskels noch mehrere Minuten warten, bis sich ein neues, der niedrigen Reizfrequenz entsprechendes Gleichgewicht zwischen dem Zellinneren, der Extracellulärflüssigkeit und dem Außenmedium eingestellt hat.

II. Wirkung von Na-Entzug auf Kontraktionskraft und Alkaligehalt des Herzmuskels

Ist die Vermehrung des Gesamtalkaligehaltes die Ursache für eine mangelhafte Kontraktionsfähigkeit des Muskels, so müßte sich die Kontraktionskraft verbessern lassen durch Maßnahmen, welche die intracelluläre Alkalikonzentration vermindern. Ein Weg dazu ist die hohe Reizfrequenz, wie unter I. gezeigt wurde. Da die Erhöhung des Gesamtalkalis auf einer den Kaliumverlust übersteigenden Natriumaufnahme beruht, kann man daran denken, die Natriuminnenkonzentration und damit den Gesamtkationengehalt durch eine Verminderung der Natriumkonzentration in der Außenlösung zu senken. Inkubiert man den Muskel in einer Lösung, in der die Hälfte des Natriumchlorids durch eine isoosmotische Saccharosemenge ersetzt ist, so nimmt der Muskel in einer Stunde, wie aus Tab. 2 hervorgeht, nur so viel Natrium auf, wie er an Kalium verliert, und die Gesamtkonzentration Na + K übersteigt nicht den Wert des frisch entnommenen Muskels. Tatsächlich ist die Kontraktionskraft dieses Muskels (Abb. 3) wesentlich größer als in „Normal-Ringer-Lösung". Schon zu Beginn der Reizung mit einer Frequenz 1/sec ist die Amplitude um 46% höher, und nach einer Stunde sind die mechanischen Amplituden mehr als doppelt so hoch als bei Inkubation in der „Normallösung".

Eine gegenüber der Norm noch stärker verminderte intracelluläre Alkalikonzentration mit excessiver Abnahme der [K] wird erreicht

durch eine Natrium-arme Lösung, die durch Fortlassung der Saccharose hypoton ist (Tab. 2). Auch hierbei entwickeln sich mit zunehmender Inkubationszeit hohe Amplituden, die nach einer Stunde die des Muskels in isotoner Lösung fast erreichen, doch ist die Kontraktionskraft während der ersten 30 min gegenüber der der Kontrollmuskeln vermindert. Eine Verringerung der [Na] durch einfache Verdünnung der „Normallösung" führte nicht zu einer Verbesserung der Kontraktionskraft (Abb. 3), sondern zeitweise zum Stillstand des Muskels. Hier verhält sich der Herzmuskel anders als das Rattenzwerchfell, welches bei Ermüdung nach Einbringen in hypotone Salzlösung eine kräftige Erholung zeigt (Lüllmann u. Muscholl).

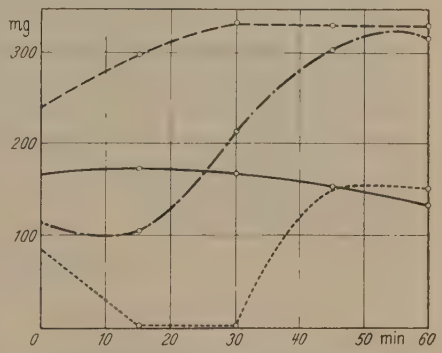


Abb. 3. Wirkung von Na-armen Lösungen auf die Kontraktionskraft (Reizfrequenz 1/sec) o———o Amplitudenverlauf in Normallösung; o— — —o in Na-armer Lösung mit Saccharose: o— · —o in Na-armer Lösung ohne Saccharose; o · · · · · · o in verdünnter Normallösung

In Abb. 6a ist die Amplitudenzunahme der Muskeln dargestellt, die nach Auswechseln der „Normallösung" gegen eine natriumarme Lösung erfolgt. Der Vergleich mit der Wirkung einer optimalen Strophanthinkonzentration ergibt, daß die Verminderung der [Na] in der Außenlösung wirksamer ist als der Zusatz von Strophanthin. Diese positiv inotrope Wirkung der Verminderung der [NaCl] um etwa die Hälfte wurde bereits von Clark 1920 an ermüdeten Warmblütervorhöfen und von McDowall u. Zayat (1952) am ermüdeten rechten Ventrikel der Ratte beobachtet. Die Untersuchung des Kationengehaltes dieser Muskeln ergibt, wie aus Abb. 6b ersichtlich, 15 min nach dem Umwechseln

Tabelle 2. *Alkaligehalt 1/sec gereizter Herzmuskelstreifen der Ratte nach einstündiger Inkubation in verschiedenen Medien (in m Mol/l Faserwasser)*:

	Zahl der Versuche	K	Na	K + Na	Trocken-Gewicht
Ausgangswerte . . .	15	138,5 ± 1,22	19,5 ± 1,25	158 ± 1,52	22,5
Normallösung	20	114 ± 1,46	59,5 ± 1,62	173 ± 1,5	22,7
Na-arme Lösung mit Saccharose . . .	6	118 ± 2,0	41 ± 1,3	159 ± 2,75	25,3
Na-arme Lösung ohne Saccharose . .	7	77 ± 3,0	30 ± 2,6	107 ± 3,5	19,7

der Lösungen neben einer geringen Abnahme der [K] eine stärkere Verringerung der [Na] und eine Verminderung der Gesamtkonzentration Na + K unter den Ausgangswert.

III. Wirkung von g-Strophanthin auf Kontraktionskraft und Alkaligehalt des Herzmuskels

Zusatz von Strophanthin in der endlichen Konzentration von $3{,}3 \times 10^{-5}$ molar zu Beginn der Inkubation bewirkt ein zunehmendes Anwachsen der Amplitudenhöhe (Abb. 4). Nach halbstündiger Reizung mit der Frequenz 1/sec hat die Kontraktionskraft etwa den gleichen Wert wie bei den Muskeln in natriumarmer Lösung (Abb. 3). Die beiden Kurven verlaufen gleichsinnig und entsprechen sich auch weitgehend in ihren Ordinatenwerten.

Ist die Wirkung von Strophanthin ($3{,}3 \times 10^{-5}$ molar) auf die Kontraktionskraft gleich der Wirkung eines natriumarmen, saccharosehaltigen Mediums, so bestehen doch deutliche Unterschiede in der Auswirkung auf die intracellulären Konzentrationen an Natrium und Kalium. Die in Abb. 5 wiedergegebenen Werte zeigen, daß die Natriumkonzentration 15 min nach Beginn der Inkubation und Reizung sich von derjenigen der unbehandelten Muskeln kaum unterscheidet und daß sie nach

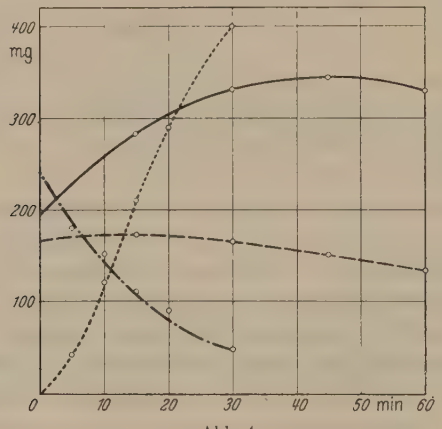


Abb. 4

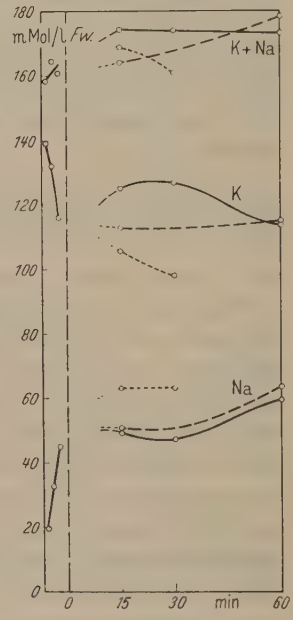


Abb. 5

Abb. 4. Wirkung von Strophanthin auf den Amplitudenverlauf von Herzmuskelstreifen (Normallösung, Frequenz 1/sec) o———o ohne Strophanthin; o———o $3{,}3 \times 10^{-5}$ molar endl. Konz.; o—·—·o $3{,}3 \times 10^{-4}$ molar endl. Konz.; o·····o Zunahme der Grundspannung bei $3{,}3 \times 10^{-4}$ molar Strophanthin

Abb. 5. Wirkung von Strophanthin auf den Alkaligehalt von Herzmuskelstreifen (Normallösung, Reizfrequenz 1/sec). o———o ohne Strophanthin; o———o Strophanthin $3{,}3 \times 10^{-5}$ molar endl. Konz.; o·····o Strophanthin $3{,}3 \times 10^{-4}$ molar endl. Konz.

60 min sogar etwas höher ist als bei der Vergleichsgruppe. Die Kaliumkonzentration ist nach 15 min um 12 m Mol/l Fw. geringer als die der Vergleichsmuskeln, dementsprechend ist hier die Gesamtkonzentration gegenüber dem Ausgangswert nur geringgradig vermehrt. Nach 60 min jedoch liegt der Kaliumwert etwas höher, und die Gesamtkonzentration Na + K ist entsprechend der weiteren Zunahme der [Na] stark vermehrt, sie ist noch höher als bei den unbehandelten Muskeln. Während also nach 15 min die verbesserte Kontraktionsstärke noch mit einer gegen-

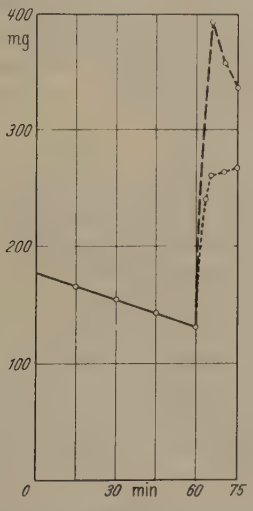


Abb. 6a

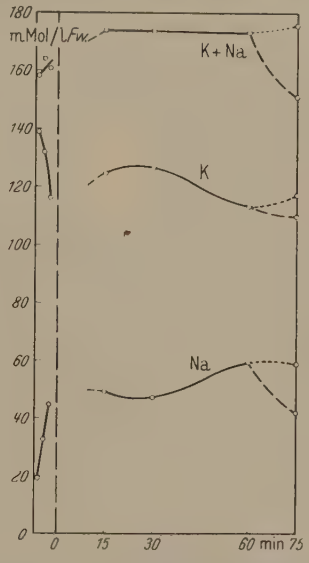


Abb 6b

Abb. 6a. Vergleich der Wirkung von Na-Entzug und Strophanthinzusatz auf den Amplitudenverlauf eine Stunde nach Reizung mit Frequenz 1/sec in Normallösung. o————o Amplitudenverlauf in Normallösung; o— — —o nach Umwechseln in Na-arme, saccharosehaltige Lösung; o·····o nach Zusatz von Strophanthin in 3,4 × 10^{-5} molar endl. Konzentration

Abb. 6b. Vergleich der Wirkung von Na-Entzug und Strophanthinzusatz auf den Alkaligehalt der Herzmuskelstreifen eine Stunde nach Reizung mit Frequenz 1/sec in Normallösung. Bezeichnung wie in Abb 6a

über den Kontrollwerten verminderten Gesamtkonzentration Na + K verbunden ist (und zwar durch einen niedrigeren Wert der intracellulären [K]), so gilt diese Beziehung 60 min nach Inkubation nicht mehr. Besonders deutlich geht die unterschiedliche Einwirkung auf den Kationengehalt des Muskels durch Strophanthin und natriumarme Lösung aus Abb. 6b hervor. Während nach dem Umwechseln von „Normallösung" auf Na-arme Lösung der Summenwert Na + K bis unter den Ausgangswert abnimmt, erfahren die einzelnen Alkali-Konzentrationen nach Zusatz von Strophanthin keine große Änderung, die [K] und damit die Summe Na + K ist sogar etwas erhöht. Wie die entsprechende Amplitudenkurve in Abb. 6a zeigt, handelt es sich hier um eine inotrop vollwirksame Dosis,

die bereits 5 min nach Zugabe annähernd das Maximum ihrer Wirkung erzielt hat.

Nach Zusatz der zehnfachen Strophanthinkonzentration nimmt die Amplitudenhöhe bei gleichzeitiger starker Spannungszunahme rasch ab, es entwickelt sich eine Kontraktur (Abb. 4). Die intracelluläre [K] geht dabei in 30 min auf 97 m Mol/l Fw. zurück, während die [Na] auf 63 m Mol/l Fw. ansteigt. Die Gesamtkonzentration entspricht etwa dem Ausgangswert (Abb. 5). Die Alkaliwerte 30 min nach Zusatz der toxischen Strophenthinkonzentration entsprechen etwa denen nach zweistündiger Reizung mit der Frequenz 10/sec (Abb. 1). In beiden Fällen besteht eine Zunahme der Grundspannung, die aber bei der Strophanthinwirkung wesentlich ausgeprägter ist und praktisch zur vollständigen Kontraktur führt.

Diskussion

Die beschriebenen Versuche sprechen für eine Abhängigkeit der Kontraktionskraft des unbehandelten Herzmuskels von seinem stationären intracellulären Alkaligehalt. Und zwar scheint die Zunahme der Gesamtkonzentration durch eine die K-Abgabe übersteigende Erhöhung der Natriumkonzentration für die Verminderung der Kontraktionsfähigkeit des Muskels von größerer Bedeutung zu sein als die Abnahme der intracellulären [K]. Dies geht einmal aus der bei erhöhter Reizfrequenz bei gleichbleibender Natriuminnenkonzentration erfolgenden weiteren Abgabe an Kalium hervor, die mit einer nach Umschalten auf niedrige Frequenz wirksam werdenden Verbesserung der Kontraktionsfähigkeit verbunden ist. Ferner sprechen dafür die Versuche, bei denen durch Verminderung der [Na] in der Außenlösung bei gleichbleibender oder sogar verminderter Kaliuminnenkonzentration eine Abnahme der intracellulären [Na] und damit ebenfalls eine Verminderung der Gesamtkonzentration Na + K zusammen mit einer Kontraktionsverbesserung, welche die inotrope Strophanthinwirkung sogar übertreffen kann, erreicht wurde.

Als Ursache für die den Kaliumverlust übersteigende Zunahme der intracellulären [Na] muß eine Insuffizienz der Muskelzellen zur aktiven Natriumelimination (der „Natriumpumpe") angesehen werden. Diese Funktion der Zellen ist in ihrem Wirkungsoptimum von der normalen Zusammensetzung des Serums abhängig. Die lediglich den Elektrolytgehalt des Serums berücksichtigenden Ersatzlösungen reichen dafür nicht aus. Dies wurde für den Kaltblütermuskel bereits von Boyle u. Conway, für Hirnschnitte des Warmblüters von Krebs, Eggleston u. Terner und für Nierenschnitte von Whittam u. Davies sowie von Mudge gezeigt. Aus den Untersuchungen von Aebi geht hervor, daß bei Inkubation von Geweben verschiedener Warmblüterorgane in Ringer-Lösung teilweise eine noch wesentlich stärkere Zunahme der intracellulären Gesamtkonzentration Na + K auftritt, als sie hier beobachtet wurde.

Da durch Natrium einzelne Fermentreaktionen gehemmt werden, ist die nach Inkubation der Herzmuskelstreifen von Ratten beobachtete Abnahme der Atmung

(Reiter, 1953) wohl zum Teil auf die Na-Anreicherung zurückzuführen.. Dem unterschiedlichen Natriumgehalt von Seewasser und Warmblüter-Ringer mit ihrem entsprechenden Einfluß auf den intracellulären Natriumgehalt schreiben auch Barron, Sights u. Wilder die Verdoppelung der Sauerstoffaufnahme von Herzmuskelschnitten verschiedener Seetiere zu, wenn sie anstatt in Fisch-Ringer bzw. Seewasser in Warmblüter-Ringer inkubiert werden.

Die Verminderung der [Na] in der Außenlösung führt zu einer Abnahme der intracellulären Konzentration an Natrium, ohne daß sich dabei das Verhältnis extra-zu intracellulärem Natrium gegenüber den Verhältnissen bei der Inkubation in „Normallösung" verbessert, der Natriumgradient ist sogar noch niedriger. Es ist deshalb anzunehmen, daß das Aktionspotential (overshoot) bei der Erregung dieser Muskeln gegenüber den Kontrollmuskeln zumindest nicht vergrößert ist. Ebenfalls wird das Ruhemembranpotential, das vom Kaliumgradienten abhängig ist (Ling u. Gerard), nicht höher sein als bei den in „Normallösung" inkubierten Muskeln, da bei gleichem extracellulärem Kaliumgehalt auch annähernd die gleiche intracelluläre [K] besteht. Man wird also, soweit man von vorliegenden Messungen des Erregungsablaufes unter vergleichbaren Verhältnissen (Draper u. Weidmann, Desmedt) schließen kann, zunächst annehmen dürfen, daß die elektrischen Daten der Muskelerregung in beiden Fällen nicht wesentlich verschieden sind. Daher ist es unwahrscheinlich, daß die kontraktionsfördernde Wirkung der Verminderung der [Na] in der Suspensionslösung über eine Beeinflussung des Erregungsablaufes zustande kommt. Es ist wahrscheinlicher, daß hier, wie bei der hohen Reizfrequenz, die Verminderung der intracellulären Gesamtkationenkonzentration entscheidend ist, und daß sie in beiden Fällen eine Verbesserung der Kontraktionsbereitschaft des kontraktilen Eiweißes bewirkt, wie es für den Fall der Kontraktionsverbesserung bei erhöhter Reizfrequenz auch von Szent-Györgyi (1953) und von Hajdu (1953) nach Untersuchungen über die Kontraktionsbedingungen isolierten Aktomyosins und nach Versuchen am gereizten Froschherzen angenommen wurde. Besonders eindrucksvoll hinsichtlich der Wirkung der Verminderung der intracellulären Kationenkonzentration sind die Versuche mit hypotoner, Na-armer Lösung. Die darin inkubierten Muskelstreifen weisen nach 60 min eine mehr als doppelt so große Kontraktionskraft auf wie die Vergleichsmuskeln. Dabei ist ihre intracelluläre [K] auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes gesunken (Tab. 2). Ein Teil dieser Konzentrationsverminderung wird auf eine Wasseraufnahme der Zellen zurückzuführen sein, denn der Wasseranteil des Gewebes stieg nach einstündiger Inkubation in der hypotonen Lösung von 77,5 auf 80,3% an.

Im Gegensatz zu den beiden kontraktionsbegünstigenden Maßnahmen, der Frequenzerhöhung und der Verminderung der [Na] in der Außenlösung, besteht bei der inotropen Wirkung des Strophanthins keine

Beziehung zwischen Kontraktionskraft und der stationären intracellulären Konzentration von Na und K (Abb. 6a u. b). Bei sofortigem Zusatz des Strophanthins ist nach einstündiger Inkubation die Gesamtionenkonzentration gegenüber den Kontrollen sogar geringgradig vermehrt (Abb. 5) bei einer Kontraktionsstärke, welche die der Kontrollmuskeln um etwa 150% übersteigt (Abb. 4).

Hinsichtlich der Kaliumwerte stimmen diese Befunde mit denen anderer Autoren überein, die nach „therapeutisch" wirkenden Strophanthinkonzentrationen keine deutliche Änderung der Kaliumkonzentration beobachten konnten (z. B. Hagen; Harvey). Da die für die Muskelfunktion ungünstig hohe intracelluläre Gesamtkonzentration bei der inotropen Strophanthinwirkung nicht vermindert ist, muß diese auf einem Mechanismus beruhen, der von dem der anderen kontraktionsverbessernden Maßnahmen verschieden ist. Es wäre als Erklärung dafür erstens denkbar, daß das Kationenoptimum für die Kontraktionsfähigkeit des Aktomyosins durch Strophanthin geändert wird. Befunde für die Stützung dieser Annahme liegen nicht vor. Die von einigen Autoren beschriebene fördernde Wirkung von herzwirksamen Glykosiden auf die Polymerisation von Actin scheidet für diese Betrachtung aus, nachdem Wollenberger gezeigt hat, daß es sich dabei um einen unspezifischen Effekt handelt, der auch von ähnlich gebauten aber nicht herzwirksamen Glykosiden bewirkt wird. Beobachtungen über eine positive Beeinflussung der Verkürzung isolierten Aktomyosins durch Digitalisglykoside ließen sich nicht bestätigen (siehe Hasselbach u. Weber).

Eine zweite Möglichkeit ist die Beeinflussung des Erregungsvorganges durch Strophanthin. Es ist vorstellbar, daß die Änderung des den Kontraktionsablauf auslösenden Erregungsprozesses an der Membran und dessen im einzelnen noch schlecht durchschaubaren Fortleitung auf das kontraktile Eiweiß die Kontraktion des Aktomyosins auch bei einer normalerweise ungünstigen Kationenkonzentration verbessert. Daß es sich dabei nicht um wesentliche Änderungen der Höhe des Ruhepotentials und des Aktionspotentials handeln kann, geht aus den Werten der intracellulären [K] und [Na] hervor, die gegenüber den Konzentrationen der „insuffizienten" Muskeln nach einstündiger Inkubation nicht signifikant verschieden sind. Tatsächlich zeigten auch die Messungen dieser Daten an Herzen verschiedener Tiere keine Veränderung bei einer inotrop wirksamen Konzentration an Herzglykosid (Trautwein 1950, Woodbury u. Hecht 1952, Dunn et al., 1952 Furchgott u. Sleator, 1954). Dagegen wurde übereinstimmend beobachtet, daß der Erregungsablauf durch inotrop wirkende Glykosidkonzentrationen in charakteristischer Weise verändert wird, indem nämlich die Repolarisation und damit auch die Dauer des ganzen Erregungsablaufes verkürzt ist.

Dementsprechend werden auch Veränderungen der T-Zacke im EKG beobachtet, die nach Untersuchungen von Robinson u. Wilson (1918) an Katzen nach 24% der letalen Digitalisdosis auftreten, also sicher dem therapeutischen Bereich angehören, während toxische Wirkungen (Irregularitäten) erst bei etwa 60% der letalen Dosis in Erscheinung treten (Farah u. Maresh). In Übereinstimmung mit der beschriebenen Verkürzung der Repolarisationszeit nimmt auch die funktionelle Refraktärzeit des Ventrikels bei der inotropen Strophanthinwirkung mit zunehmender Leistungsfähigkeit des Herzens ab (Méndez u. Méndez).

Als Grundlage für diese Verkürzung der Repolarisation können nur Änderungen in der Austauschrate der Kationen bei der Erregung, hier in erster Linie des Kaliums, angesehen werden. Daß dies tatsächlich der Fall ist, geht aus den in Abb. 5 wiedergegebenen Versuchen mit

Strophanthin hervor. Die Muskeln, die während der Zeit der Präparation bei Zimmertemperatur sehr rasch Kalium verlieren, akkumulieren während der Inkubation bei 37° C zunächst wieder Kalium, bis später — nach 30 min — ihre intracelluläre [K] wieder stetig abnimmt. Die Rückresorption wird durch eine inotrop wirksame Strophanthinkonzentration verhindert. Dementsprechend ist die intracelluläre [K] nach 15 min dauernder Inkubation bei 37° C um etwa 12 m Mol/l Fw. niedriger als bei den nicht mit Strophanthin behandelten Muskeln. Dieser Unterschied ist signifikant. Aus diesem Versuch geht ferner hervor, daß nicht nur die Rückresorption, sondern auch die Auswärtsbewegung des Kaliums gehemmt ist, und zwar in etwa dem gleichen Ausmaß, sonst könnte die intracelluläre [K] in den folgenden 45 min der Inkubation trotz Reizung des Muskels nicht annähernd stationär bleiben. Hinsichtlich der Natriumbewegung gibt der Kurvenverlauf der Abb. 5 keinen Anhalt für eine wesentliche Veränderung gegenüber den Kontrollmuskeln.

Hemmung der Rückresorption von Kalium und der Elimination von Natrium wurde an Erythrocyten (Schatzmann) und an Froschmuskeln (Matchett u. Johnson) beobachtet. Schatzmann und Witt interpretieren ihre Versuche über den Kaliumaustritt des gereizten Frosch-Sartoriusmuskels ebenfalls durch die Annahme einer gleichmäßigen Hemmung von K-Austritt und Rückresorption.

Völlig anders ist die Wirkung von Strophanthin auf den stationären Kationengehalt in kontrakturerzeugender Konzentration. Sie führt zu einer fortschreitenden Abnahme des Kalium- und Zunahme des Natriumgehaltes (Abb. 4 u. 5). Verminderung des K-Gehaltes des Herzmuskels bei toxischer Strophanthinkonzentration wurde bereits von Hagen (1939) beschrieben und ist später mehrfach bestätigt worden. Es liegt nahe, anzunehmen, daß dieser toxische Effekt auf einer völligen Hemmung der Rückresorption von Kalium und einer Hemmung des aktiven Auswärtstransportes von Natrium beruht. *In der Wirkung von Strophantin auf den Kationenhaushalt des Herzmuskels lassen sich demnach deutlich zwei Stadien abgrenzen, die hinsichtlich ihrer Konzentrationsabhängigkeit den Wirkungen auf die Mechanik des Herzmuskels entsprechen: der kontraktionsverbessernden und der kontrakturerzeugenden Wirkung.*

Zusammenfassung

1. Der rechte Ventrikel von Ratten enthält gleich nach der Tötung 138,5 m Mol/l Faserwasser Kalium und 19,5 m Mol/l. Fw Natrium. Während der Präparation von Streifen in sauerstoffgesättigter Salzlösung von 20° C nimmt der K-Gehalt des Muskels rasch ab und der Natriumgehalt entsprechend zu. Nach Inkubation bei 37° C findet zunächst eine Rückresorption an K statt bei wesentlich geringerer Na-Elimination. Dementsprechend kommt es zu einer Erhöhung der Summe Na + K in den Muskelzellen. Nach 30 min Inkubation beginnt eine stetige Abnahme des intracellulären Kaliums bei äquimolarer Zunahme an Natrium.

2. Hohe Reizfrequenz (10/sec) führt zu einer Verminderung der vorher erhöhten intracellulären Konzentration Na + K, in den ersten 30 min durch verstärkte Natriumelimination, später durch Kaliumverlust. Die Kontraktionskraft ist zu Beginn während der Reizung und später nach Umschalten auf niedrige Reizfrequenz gegenüber der Kontraktionskraft bei dauernder Reizfrequenz 1/sec stark erhöht.

3. Verminderung der [Na] in der Außenlösung bewirkt bei gleichbleibender Kaliuminnenkonzentration eine Abnahme der intracellulären Natriumkonzentration mit einer Verminderung der Gesamtkonzentration Na + K. Die Kontraktionskraft übersteigt dabei die der Kontrollmuskeln in „Normallösung" wesentlich, sie ist unter Umständen höher als nach Strophanthin.

4. Die Beziehung zwischen Abnahme der erhöhten intracellulären Alkalikonzentration und Zunahme der Kontraktionskraft gilt nicht für die *inotrope* Strophanthinwirkung. Diese ist verbunden mit einer Hemmung der Kaliumrückresorption und einer Hemmung der Kaliumauswärtsbewegung. Strophanthin in *kontrakturerzeugender* Konzentration bewirkt parallel zur Entwicklung der Kontraktur eine Abnahme der intracellulären Kalium- und eine Zunahme der intracellulären Natriumkonzentration.

Frau Juliane Noé danke ich für ihre verständnisvolle Mithilfe bei den Versuchen.

Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literatur

Aebi, H.: Helvet. physiol. Acta **11**, 96 (1953). — Bammer, H., u. K. E. Rothschuh: Z. exper. Med. **119**, 402 (1952). — Barron, E. S. G., W. P. Sights und V. Wilder: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 338 (1953). — Boyle, P. J., and E. J. Conway: J. of Physiol. **100**, 1 (1941). — Clark, A. J.: J. of Physiol. **54**, 267 (1920). — Clarke, N. E., and R. E. Mosher: Circulation (New York) **5**, 907 (1952). — Conway, E. J.: Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. **20**, 56 (1945). — Desmedt, J. E.: J. of Physiol. **121**, 191 (1953). — McDowall, R. J. S., and A. F. Zayat: J. of Physiol. **117**, 75P (1952). — Draper, M. H., and S. Weidmann: J. of Physiol. **115**, 74 (1951). — Dunn, A. L., A. L. Bennett and A. R. McIntyre: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **106**, 382 (1952). — Farah, A., and G. Maresh: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **92**, 32 (1948). — Fleckenstein, A.: Der Kalium-Natrium-Austausch. Heidelberg: Springer-Verlag, 1955. — Furchgott, R. F., and W. Sleator: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **110**, 20 (1954). — Hasselbach, W. and H. Weber: Pharmacological Reviews **7**, 97 (1955). — Hagen, P. S.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **67**, 50 (1939). — Hajdu, St.: Amer. J. Physiol. **174**, 371 (1953). — Harvey, S. C.: Federal Proc. **13**, 364 (1954). — Holland, W. C., M. E. Greig and C. E. Dunn: Amer. J. Physiol. **176**, 227 (1954). — Kaunitz, H.: Z. klin. Med. **131**, 192 (1937). — Krebs, H. A., L. V. Eggleston and C. Terner: Biochemic. J., **48**, 530 (1951). — Kühns, K.: Z. physiol. Chem. **298**, 278 (1954). — Lee, K. S.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **112**, 484 (1954). — Ling, G., and R. W. Gerard: Nature (Lond.) **165**, 113 (1950). — Lowry, O. H.: Biol. Symp. **10**, 233 (1943). — Lüllmann, H., u. E. Muscholl: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**,

209 (1954). — Malorny, G., u. H. Netter: Pflügers Arch. **238**, 153 (1937). — Matchett, P. A., and J. A. Johnson: Federat. Proc., **13**, 384 (1954). — Méndez, R., and C. Méndez: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **107**, 24 (1953). — Mudge, G. H.: Amer. J. Physiol. **165**, 113 (1951). — Müller, F.: Pflügers Arch. **258**, 358 (1954). — Reichel, H.: Persönl. Mitteilung. — Reiter, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 315 (1953); **225**, 138 (1955). — Robinson, G. C., and F. N. Wilson: J. Pharmacol. **10**, 491 (1918). — Schatzmann, H. J.: Helvet. physiol. Acta **11**, 346 (1953). — Schatzmann, H. J., and P. N. Witt: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **112**, 501 (1954). — Sutherland, G. B., C. Thomson y G. A. Feigen: Arch. Inst. Cardiol. México **22**, 714 (1952). — Szent-Györgyi, A.: Chemical Physiology of Contraction in Body and Heart Muscle. New York: Acad. Press, 1953. — Trautwein, W.: Pflügers Arch. **252**, 573 (1950). — Trautwein, W., u. J. Dudel: Pflügers Arch. **260**, 24 (1954). — Weber, H. H. u. H. Portzehl: Erg. Physiol. **47**, 369 (1952). — Whittam, B., and R. E. Davies: Biochemic. J. **55**, 880 (1953). — Wollenberger, A.: Experientia (Basel) **10**, 311 (1954). — Woodbury, L. A., and H. H. Hecht: Circulation (New York) **6**, 172 (1952).

Priv.-Doz. Dr. Melchior Reiter, München 15,
Pharmakol. Institut d. Univ., Nußbaumstr. 28

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 316—327 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. Dr. A. W. Forst)

Über Wirkungsänderungen der Barbitursäuren durch Beeinflussung der Methylierungsvorgänge am Stickstoff in vivo*

Von

R. Deininger

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. Juli 1955)

Noch vor wenigen Jahren war über das Schicksal der Barbitursäuren im Organismus praktisch nichts bekannt. Erst die Schulen von Butler und Bush, von Dyke, Brodie, Richards ermöglichten einen Einblick in das Stoffwechselgeschehen der Barbitursäuren. Die Arbeiten von Butler und Bush brachten die Erkenntnis, daß der Abbau der N-methyl-Barbitursäuren mehr oder weniger über die Entmethylierung verläuft. Von der applizierten Menge N-methyl-Barbital (N-methyl-Veronal) fanden sie in Harnanalysen 69% als Veronal und nur 2—3% als unveränderte Verbindung wieder. In Versuchen mit N-methyl-phenyläthyl-Barbitursäure (Prominal) isolierten sie 4% entmethylierte Barbitursäure (Luminal) aus dem Harn. Kein unverändertes Prominal wurde nachgewiesen. Berechnungen aus Harnanalysen ergeben, daß die Hälfte des applizierten Prominals entmethyliert wurde. Weiterhin erkannten sie eine Entmethylierung von Narkonumal und Evipan. Im Vergleich zu N-methyl-Veronal und Prominal spielte die Entmethylierung von Narkonumal und Evipan nach Berechnungen der Autoren nur eine untergeordnete Rolle. Aus Harnanalysen bei Hunden errechneten sie nach Applikation von Narkonumal eine Entmethylierung von 30% und darunter, nach Gabe von Evipan wurden nur 2% entmethyliert. Es ist bekannt, daß die Einführung einer Methylgruppe am N-Atom der Barbitursäuren die Stabilität des Ringes in einem Grade verändert, der von anderen anwesenden Gruppen abhängig ist. Wahrscheinlich verläuft die weitere Entgiftung von Nor-Evipan ebenso wie von Phanodorm über die Oxydation des Cyclohexenylringes. Bush, Butler und Dickison konnten im Harn nach Gabe von Evipan die 5-Cyclohexenonyl-5-methyl-Barbitursäure isolieren. Weiterhin entdeckten sie noch zwei weitere Verbindungen im Harn, wahrscheinlich isomere Ketoderivate von Evipan (5-Cyclohexenonyl-1,5-dimethyl-Barbitursäure).

In vorliegender Arbeit wird gezeigt, daß am Stickstoff der Barbitursäuren neben einer Entmethylierung auch eine Aufmethylierung möglich ist. Die Methylierungsvorgänge in vivo sind durch Methyl-donatoren und -acceptoren pharmakologisch beeinflußbar.

Zunächst war es notwendig einen pharmakologischen Test zu finden, der es ermöglichte die Nor-Barbitursäuren von den N-methyl-Barbitursäuren qualitativ zu unterscheiden. Die denervierte Mäusepupille erfüllte

* Herrn Professor Dr. Dr. A. W. Forst zum 65. Geburtstag gewidmet.

diese Forderung. Die Pupillenwirkung der Barbitursäuren Evipan und Eunarkon wurde von Emmelin und Besold untersucht. Beide Autoren fanden, daß Evipan und Eunarkon die normale Pupille erweitern. Als Testobjekt diente in unseren Versuchen die denervierte Pupille der weißen Maus nach der Methode von Forst u. Deininger (1952a).

Versuchsergebnisse

Die in Tab. 1 aufgeführten Barbitursäuren ließen sich wirkungsmäßig in zwei Gruppen teilen. Während die N-methyl-Barbitursäuren die denervierte Pupille ohne Ausnahme erweiterten, wirkten die Nor-Barbitursäuren miotisch. In folgender Tab. 1 sind die Quotienten $\frac{\text{Pupillenweite}}{\text{Anfangswert}}$ der Barbitursäuren aufgeführt.

Tabelle 1. *Pupillenwirkung der Barbitursäuren*

Barbitursäuren	Dosis γ/g		Quotient der Pupillenweite Minuten 15	30	45	60
Cyclohexenyl-methyl-N-methyl-Barb. (Evipan)	200	D	2,6	3,0	4,0	4,2
		N	2,0	2,5	3,0	3,0
	100	D	2,0	2,5	2,2	2,2
		N	1,8	1,8	2,2	2,2
Allyl-isopropyl-N-methyl-Barb. (Narkonumal)	150	D	1,1	2,5	2,6	2,2
		N	1,1	1,7	2,3	1,9
Isopropyl-bromallyl-N-methyl-Barb. (Eunarkon)	100	D	2,0	1,8	1,5	1,2
		N	1,5	1,5	1,1	1,0
Phenyläthyl-N-methyl-Barb. (Prominal)	200	D	1,8	1,9	1,8	1,5
		N	1,0	1,6	1,8	1,5
Diäthyl-N-methyl-Barb. N-methyl-Veronal)	200	D	1,1	1,3	1,3	1,3
		N	1,1	1,0	1,0	1,0
Cyclohexenyl-methyl-Barb.[1] (Nor-Evipan)	200	D	0,9	0,6	0,5	0,6
		N	0,9	0,7	0,6	0,6
Allyl-isopropyl-Barb. (Numal)	100	D	0,9	0,7	0,6	0,5
		N	0,9	0,6	0,6	0,6
Phenyl-äthyl-Barb. (Luminal)	125	D	0,75	0,5	0,5	0,5
		N	0,7	0,5	0,5	0,5
Diäthyl-Barb. (Veronal)	200	D	0,7	0,5	0,4	0,4
		N	0,7	0,5	0,5	0,5
Isobutyl-bromyllyl-Barb. (Pernocton)	75	D	1,0	0,8	0,9	0,8
		N	1,0	1,0	1,0	1,0

Anm.: D = Denervierte Pupille, N = Normale Pupille.

[1] Für die freundliche Überlassung von Nor-Evipan danken wir Herrn M. T. Bush und dem Stearling-Winthrop Research Institut.

Da eine genaue Messung der Miosis an der Mäusepupille nicht möglich ist, untersuchten wir den Effekt des Cocains an der durch die Nor-Barbitursäuren verengten Pupille. Das Maß der Cocainhemmung ermöglichte die quantitative Messung der Nor-Barbitursäuren. Vorversuche erbrachten die Erkenntnis, daß eine Cocainlösung 1 : 1000 die denervierte Pupille um das 6fache des Anfangswertes erweiterte.

Methode. Zur Verwendung gelangten je 6 Mäuse im Gewicht von 20—25 g. 60 min nach s.c. Injektion der Barbitursäure wurde 1 Tropfen der Cacainlösung 1:1000 auf das Auge gebracht und 10 min belassen. Die Pupillenweite wurde vor und nach der Cocainisierung abgelesen.

In der Tab. 2 sind die Dosis-Wirkungsquotienten nach der Gleichung $\frac{\text{Hemmung } \% \times 100}{\text{Dosis } (\gamma/\text{g})}$ dargestellt. (Vollständige Unterdrückung der Cocainwirkung = 100%ige Hemmung.)

Alle untersuchten Nor-Barbitursäuren hemmten die Cocainwirkung.

Vergleicht man die Intensitätsfolge der Cocainhemmung (Tab. 2) mit der Reihenfolge der Barbitursäuren hinsichtlich ihrer Narkosewirkung, wie sie Butler (1942) nach seinen Versuchsergebnissen zusammenstellte, dann ergeben sich gewisse Beziehungen. Butler fand, daß die Narkosewirkung von Veronal und Nor-Evipan ebenfalls schwächer ist als die der übrigen Barbitursäuren.

Tabelle 2. *Hemmung der Cocainmydriasis durch Barbitursäure*

Barbitursäuren	Dosis γ/g	Dosis-wirkungs-quotient
Dial	100	73
Luminal . .	100	70
Pernocton .	100	69
Numal . .	100	65
Medomin .	100	40
Nor-Evipan	200	35
Veronal . .	200	23

Die N-methylierten Barbitursäuren wie Narkonumal 100 γ/g, N-methyl-Veronal 200 γ/g, Evipan 100 γ/g, Eunarkon 100 γ/g und Prominal 100 γ/g subcutan veränderten die Cocainwirkung nicht. Andere Narkotica, wie Chloralose 125 γ/g, Avertin 200 γ/g, Chloralhydrat 375 γ/g und Urethan 1 mg/g subcutan appliziert, zeigten eine Cocainhemmung in der aufgeführten Reihenfolge, wobei Chloralose am stärksten und Urethan am schwächsten wirkten.

Im folgenden legten wir uns die Frage vor, ob die N-methylierten Barbitursäuren durch Verlust ihrer Methylgruppe als Methyldonatoren wirken können. Forst u. Deininger (1952a) zeigten, daß Adrenalin an der denervierten Pupille stärker wirkt als Nor-Adrenalin (Arterenol). In weiteren Versuchen fanden wir (1951, 1952b), daß eine Aufmethylierung des Arterenols, wie sie durch Methyldonatoren möglich ist, sich in einer Verstärkung der Mydriasis anzeigt. Diese verstärkte Mydriasis ist nach unserer Ansicht Folge einer Methylierung, da sie durch Tellur aufgehoben werden kann. Tellur fungiert dabei als Methylfänger derart, daß es zu Dimethyltellurit aufmethyliert wird. Mit der bereits beschriebenen Methode an der denervierten Pupille fanden wir 1954, daß die mydriatische Wirkung des Arterenols auch durch N-methylierte Barbitursäuren

verstärkt wird. Die Annahme liegt nahe, daß es sich dabei um eine Methylierung handelt, da diese Verstärkung durch Tellur ebenfalls aufgehoben werden kann.

In Abb. 1 sind die Versuchsergebnisse nach wiederholter i. v. Injektion von Nor-Adrenalin an der denervierten Pupille ohne Evipan, in Abb. 2 ist derselbe Versuch mit Evipan und die Beeinflussung durch Tellur dargestellt.

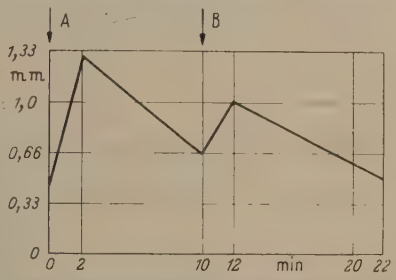


Abb. 1. Wirkungskurve nach wiederholter i.v. Injektion von Nor-Adrenalin an der denervierten Pupille. Absz.: Zeit in Minuten. Ord.: Pupillenweite in Millimeter. *A* 1. Injektion von 0,1 γ/g Nor-Adrenalin. *B* 2. Injektion von 0,1γ/g Nor-Adrenalin

Gleiche Ergebnisse erhielten wir nach N-methyl-Veronal 200γ/g, Prominal 100 γ/g, Narkonumal 100γ/g und Eunarkon 50γ/g. Kontrollversuche, bei denen an Stelle von Nor-Adrenalin, Adrenalin verwendet wurde, zeigten, daß die N-methyl-Barbitursäuren eine nachfolgende Adrenalininjektion 0,025 γ/g i. v. nicht verstärken.

Wie vorangegangene Versuche gezeigt haben, ist die Pupillenwirkung der Barbitursäuren von der Methyl-Substitution am Stickstoff weitgehend abhängig. Der Nachweis der biologisch labilen Methyl-Gruppe bei den methylierten Barbitursäuren konnte am Beispiel der Aufmethylierung von Nor-Adrenalin erbracht werden. So war es von Interesse, diese Methylierungsvorgänge pharmakologisch zu beeinflussen. Es zeigte sich, daß die miotische Wirkung des Nor-Evipans durch Stoffe wie Acetylcholin und Cholin in eine Mydriasis umgewandelt wird (Abb. 3). Diese Umwandlung der Pupillenwirkung nach Nor-Evipan durch Cholin ist ein Effekt der in vivo gebildeten N-methyl-Barbitursäure, da sie durch Tellur (Abb. 3) verhindert wird.

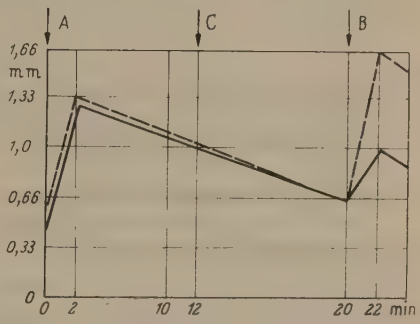


Abb. 2. Wirkungskurve wiederholter i.v. Injektion von Nor-Adrenalin vor und nach s.c. Applikation von Evipan, mit und ohne Tellur, an der denervierten Pupille. Absz.: Zeit in Minuten. Ord.: Pupillenweite in Millimeter. *Ausgezogene Linie: A* 1. Injektion von Nor-Adrenalin 0,1 γ/g i.v. *B* 2. Injektion von Nor-Adrenalin 0,1 γ/g i.v. und Na-Tellurit 0,25 γ/g i.v. *C* Evipan50 γ/g s.c. *Unterbrochene Linie:* Wie ausgezogene Linie, jedoch ohne Tellur

In den folgenden Versuchen wurde die *Narkosedauer* der einzelnen Barbitursäuren und ihre pharmakologische Beeinflussung bestimmt. Versuche, die Narkosewirkung der Barbitursäuren zu verstärken, wurden zahlreich unternommen.

Im Jahre 1942 zeigten Slaughter und später Frommel u. Mitarb. die synergistische Wirkung von Somnifen, Luminal, Narkonumal mit Prostigmin und verwandten Verbindungen, Acetylcholin, Doryl und Pilocarpin. Lamson u. Mitarb., Bester und Nelson fanden eine Verstärkung der Narkose von Barbitursäuren (Evipan, Narkonumal, Veronal, Seconal, Pentobarbital und Pentothal) durch Glucose, Zuckerstoffwechselprodukte und Adrenalin. Ebenso verlängern hochkonzentrierte Mineralsalzlösungen nach Richards u. Mitarb., Antihistaminica nach Winter, Antabus (Tetraäthyl-Thiuramdisulfid) nach Winters u. Mitarb. die Barbitursäurenarkose.

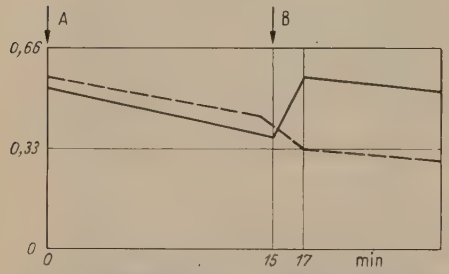


Abb. 3. Wirkungskurve von Cholin nach Nor-Evipan, mit und ohne Tellur an der denervierten Pupille. Absz.: Zeit in Minuten. Ord.: Pupillenweite in Millimeter. *Ausgezogene Linie: A* Nor-Evipan 100 γ/g i.v.; *B* Cholin 10 γ/g i.v. *Unterbrochene Linie: A* Nor-Evipan 100 γ/g i.v.; *B* Cholin 10 γ/g und Na-Tellurit 2,5 γ/g i.v.

Methode. Zur Verwendung gelangten je 10 Mäuse im Gewicht von 20—25 g. Es wurden jeweils zwei Narkosestadien bestimmt.

I = Vollkommene Seitenlage, bei starken Reizen keine Korrekturversuche.

II = Aufrichten aus Seitenlage, spontan oder aus passiv erzielter Seitenlage.

Die Zeit zwischen beiden Narkosestadien wurde gemessen.

Versuchsergebnisse

Es zeigte sich in Übereinstimmung mit der schon erwähnten Beobachtung Butlers (1942), daß die N-methylierten Barbitursäuren in niedrigerer Dosierung Seitenlage hervorriefen als die entsprechenden Nor-Barbitursäuren. Dieser Unterschied war besonders deutlich bei Evipan und Nor-Evipan, sowie N-methyl-Veronal und Veronal.

Nach i. v. Injektion von 100 γ/g Nor-Evipan erfolgte keine Seitenlage, während eine zusätzliche s. c. Injektion von 50 γ/g Acetylcholin bei allen Tieren nach 10—20 min für die Dauer von 40 bis 50 min Seitenlage hervorrief. Eine Dosierung von 200 γ/g Nor-Evipan, die eine 30—40 min dauernde Seitenlage zur Folge hatte, erfuhr nach zusätzlicher i. p. Injektion von 100 γ/g Cholin eine Verlängerung der Wirkung auf 90—140 min, d. i. eine 3—4fache Verlängerung. Evipan allein injiziert verursachte bereits in einer Dosierung von 100 γ/g s. c. Seitenlage über einen Zeitraum von 60 min. Die Verlängerung der Narkosedauer durch die beschriebenen Stoffe war sowohl nach s. c. als auch nach i. v. Injektion der Barbitursäuren möglich. Physostigmin 0,5 γ/g i. p. wirkte in ähnlichem Sinne. Nach unseren vorangegangenen Versuchen an der denervierten Pupille konnten wir annehmen, daß diese Verstärkung der Narkose Folge einer Methylierung ist. Deshalb untersuchten wir auch die Einwirkung des Methionins auf die Narkosedauer der Barbitursäuren. Wir wählten als Methyldonator Methionin, da dieses nach stattgefundener Entmethylierung keinerlei pharmakologische Wirkung zeigt, die den beobachteten Reaktionsablauf verschleiern könnte.

Tatsächlich zeigte sich, daß Methionin die Narkosedauer der Barbitursäuren wesentlich verstärkt. Dabei wurden die Nor-Barbitursäuren und die N-methylierten Barbitursäuren mit Ausnahme von Prominal verstärkt. Zwischen der Wirkungsverstärkung der einzelnen Barbitursäuren bestanden jedoch Unterschiede insofern, als die Narkosedauer der Nor-Barbitursäuren durch Methionin in weit stärkerem Maße verlängert wurde, als die Wirkung der entsprechenden N-methylierten Verbindungen. Abb. 4 zeigt die Dauer der Seitenlage von Nor-Evipan und die Wirkungsverlängerung durch Methionin. Eine 100%ige Wirkung bedeutet Seitenlage bei allen Tieren.

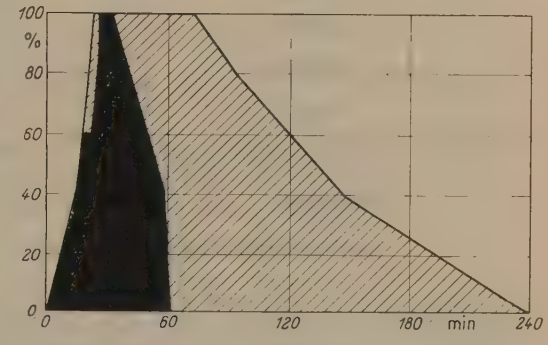


Abb. 4. Narkosedauer von Nor-Evipan mit und ohne Methionin. Absz.: Zeit in Minuten. Ord.: Narkosewirkung (Seitenlage siehe Text). *Schwarze Fläche* = Wirkung nach 200 γ/g Nor-Evipan s.c. *Gestreifte Fläche* = Wirkung nach 200 γ/g Nor-Evipan s.c. und Methionin 500 γ/g i.p.

In Abb. 5 sind die Ergebnisse der untersuchten Barbitursäuren und deren Beeinflussung durch Methionin zusammengestellt. Die graphische Darstellung zeigt die Narkosedauer vom Eintreten der Seitenlage bis zum Aufrichten.

Aus den Abb. 4 u. 5 ist deutlich zu ersehen, daß die Nor-Barbitursäuren durch Methionin in ihrer Narkosedauer erheblich verstärkt wurden. So betrug die Verlängerung bei Nor-Evipan das 4fache der Eigenwirkung. Eine Aufhebung bzw. Verringerung der Narkosewirkung durch Tellur, analog den Versuchen an der Pupille, konnte bei diesen Versuchen nicht erreicht werden. Durch die hohe Toxicität von Tellur war es nicht möglich, annähernd äquivalente Mengen Tellur zu applizieren. Auf die Narkosedauer von Urethan, Chloralhydrat und Chloralose hatte Methionin keinen Einfluß.

Zur Klärung der Frage der Methylierungsvorgänge am Stickstoff der Barbitursäuren in vivo war es nunmehr erforderlich eine Nachweismethode zu entwickeln, die es ermöglichte, die Barbitursäuren qualitativ und quantitativ nachzuweisen. Eine papierchromatographische Methode wurde für diesen Zweck ausgearbeitet.

Methode. Für die Barbituratbestimmung im Blut verwendeten wir Mäuse (Gewicht 20—25 g) in Gruppen zu je 10 Tieren. Die Bestimmungen wurden 30, 60 und 120 min nach Applikation der Barbitursäuren vorgenommen. Das durch Dekapitation gewonnene Blut (5 cm^3/10 Tiere) wurde nach unserer Methode (1955b) mit Äther ausgeschüttelt, gereinigt und für die papierchromatographische Weiterbehandlung eingeengt wie folgt:

Zu 5 cm³ Blut wurden 20 cm³ Phosphatpuffer p_{H_3} und 2 cm³ einer 10%igen $MgCl_2$-Lösung zugegeben und anschließend mit 20 cm³ Äther ausgeschüttelt. Der mit Natriumsulfat getrocknete Ätherextrakt wurde durch eine Säule mit 0,3 g Aktivkohle und 0,3 g Aluminiumoxyd (nach Brockmann) geschickt. Die Säule wurde über ein Rezeptionsgefäß, das zur Verdunstung des Äthers über ein Wasserbad befestigt war, an ein Vakuum geschlossen. Der Trockenrückstand im Rezeptions-

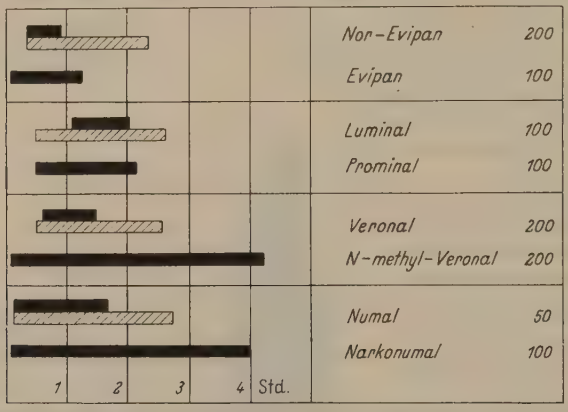


Abb. 5. Graphische Darstellung der Narkosedauer der Barbitursäuren mit und ohne Methionin. (Registriert wurde jeweils der Zeitpunkt, bei dem 50% der Tiere in, bzw. aus der Seitenlage kamen.) Absz.: Zeit in Stunden. *Schwarze Linie* = Narkosedauer nach Barbitursäure s.c. Gamma/Gramm. *Gestreifte Linie* = Narkosedauer nach Barbitursäure Gamma/Gramm und Methionin 500 γ/g i.p.

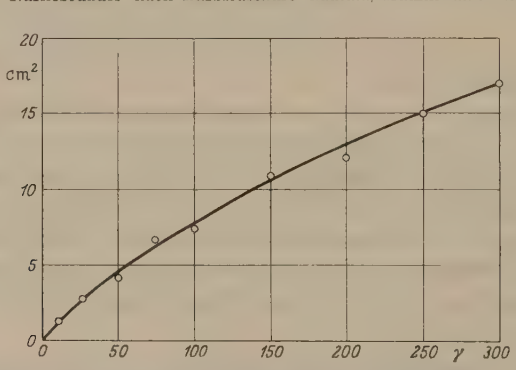


Abb. 6. Quantitative Bestimmungskurve von Evipan und Nor-Evipan. Absz.: Menge Evipan oder Nor-Evipan in Gamma. Ord.: Fläche der Extinktionswerte in Quadratzentimeter, nach Messung der mittels papierchromatographischer Entwicklung erhaltenen Endflecke

gefäß wurde mit Alkohol aufgenommen und auf den Startpunkt des Papieres gebracht zur weiteren papierchromatographischen Trennung. (Einzelheiten im Original [1956]).

Papierchromatographische Trennung. Es wurde eindimensional auf „Schleicher und Schüll-Papier" Nr. 2043b bei 22° aufsteigend entwickelt. Für die Trennung verwendeten wir die Lösungsmittelkombination: Isopropanol:Chloroform:Ammoniak konz. (25%ig) im Verhältnis 5:2:3. Diese Lösungsmittelkombination hat sich bei quantitativem Arbeiten durch scharfe Trennung und Kleinbleiben der Endflecken bewährt. Die Endflecken wurden mit Kaliumpermanganat (10%ige wäßrige

Lösung) nach ALGERI u. WALKER mittels Besprühung sichtbar gemacht. Anschließend wurde das Papier in fließendem Wasser ausreichend gewaschen. Die R_f-Werte waren für Evipan = 0,82 und für Nor-Evipan = 0,65. Die Endflecken wurden mit dem Zusatzgerät des Photometers „Eppendorf" mit Filter Hg 366 nm bestimmt. Die Extinktionswerte wurden graphisch aufgetragen.

Quantitative Bestimmung. Die quantitative Bestimmung der Barbitursäuren wurde durch Planimetrierung des — nach der photometrischen Messung erhaltenen – Kurvenbildes erreicht. Die durch Flächenbestimmung erhaltenen Werte ließen sich in geometrische Beziehung zur Barbituratmenge bringen. Eine einwandfreie Bestimmung von Nor-Evipan und Evipan war im Bereich von 10—300 γ möglich. In Abb. 6 sind die Flächen in Quadratzentimeter von 10—300 γ Evipan, Nor-Evipan aufgezeichnet. Die Werte waren für Evipan und Nor-Evipan gleich. Die in Abb. 6 aufgezeichneten Maße gelten für Evipan und Nor-Evipan.

Versuchsergebnisse. Nach subcutaner Injektion von 100 γ/g Evipan wurde in allen Bestimmungen neben Evipan auch die entmethylierte Verbindung, das Nor-Evipan gefunden. In Abb. 7 sind die Blutkonzentrationen von Evipan und Nor-Evipan dargestellt. Es zeigte sich, daß der Blutspiegel von Evipan im Verlauf der 2 Std rasch abnahm, während die Nor-Evipankonzentration sich nur gering veränderte.

In früheren Versuchen (1955a) konnten wir zeigen, daß nach s.c. Injektion von Nor-Evipan im Blut von Mäusen neben Nor-Evipan qualitativ auch Evipan, die aufmethylierte Verbindung nachweisbar war. Der qualitative Nachweis dieses Methylierungsproduktes stützt sich auf die R_f-Wertbestimmung von zwei verschiedenen Lösungsmittelkombinationen. Sowohl die Trennung mit n-Butanol gesättigt mit N Ammoniak-Lösung (ALGERI u. WALKER) R_f-Wert von Evipan = 0,72, für Nor-Evipan = 0,5, als auch mit dem bereits beschriebenen Lösungsmittel Isopropanol:Chloroform:Ammoniak im Verhältnis 5:2:3 ermöglichte die Identifizierung des in vivo gebildeten Evipans.

Für die quantitative Bestimmung wurden im folgenden 2 Versuchsgruppen angesetzt. Die 1. Gruppe erhielt Nor-Evipan 200 γ/g s. c., die 2. Gruppe erhielt Nor-Evipan 200 γ/g s. c. und Methionin 500 γ/g i. p. Während die Nor-Evipankonzentration im Blut bei beiden Gruppen gleich war, zeigten sich Unterschiede in der Evipankonzentration. So lag die Evipankonzentration der 1. Gruppe ohne Methionin unter dem quantitativ meßbaren Bereich von 10 γ in 5 cm^3 Blut von 10 Mäusen, während die Evipankonzentration der 2. Gruppe mit Methionin höher und damit meßbar war (Abb. 7).

Eine Beziehung zwischen dem Blutspiegel von Nor-Evipan und der narkotischen Wirkung konnte nach diesen Ergebnissen nicht angenommen werden. Nach 30 und 60 min zeigten die Tiere beider Gruppen eine 100%ige Seitenlage. Dagegen befanden sich in der Gruppe mit Methionin nach 120 min noch 70% der Tiere in Seitenlage, während die Tiere ohne Methionin zu diesem Zeitpunkt bereits vollständig erwacht waren. Nachdem bei beiden Gruppen der Nor-Evipanspiegel gleich blieb und demnach keine Beziehung zur Narkosewirkung aufwies, ist vielmehr anzunehmen, daß der erhöhte Evipananteil der Gruppe mit Methionin die

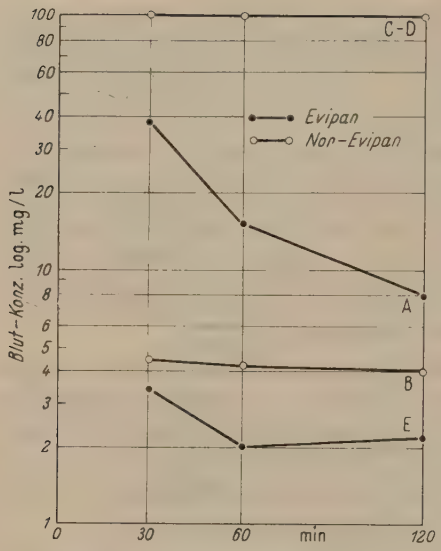


Abb. 7. Blutspiegel von Evipan und Nor-Evipan. Absz.: Zeit in Minuten. Ord.: Wiedergefundene Menge Barbitursäure in Gamma. Nach s.c. Injektion von Evipan 100 γ/g. *A* Blutspiegel von Evipan *B* Blutspiegel von Nor-Evipan. Nach s. c. Injektion von Nor-Evipan 200 γ/g; *C* Blutspiegel von Nor-Evipan, nach s. c. Injektion von Nor-Evipan 200 γ/g und i.p. Ij. Methionin 500 γ/g. *D* Blutspiegel von Nor-Evipan; *E* Blutspiegel von Evipan

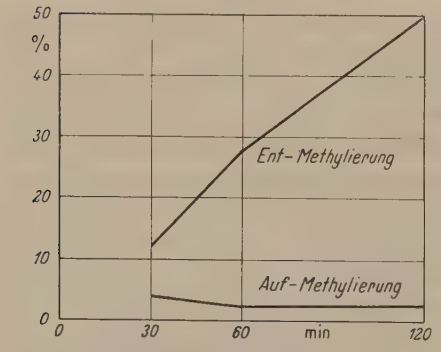


Abb. 8. Entmethylierung von Evipan und Aufmethylierung von Nor-Evipan. Absz.: Zeit in Minuten. Ord.: *Entmethylierung:* Prozentualer Anteil von entmethyliertem Evipan (Nor-Evipan) zur wiedergefundenen Menge Evipan nach Applikation von Evipan 100 γ/g s.c. *Aufmethylierung;* Prozentualer Anteil von aufmethyliertem Nor-Evipan (Evipan) zur wiedergefundenen Menge Nor-Evipan nach Applikation von Nor-Evipan 200 γ/g s.c. und Methionin 500 γ/g i.p.

Narkoseverlängerung hervorgerufen hat. Weiterhin fiel auf, daß die Evipankonzentration der Versuchsgruppe, die Evipan allein erhalten hatte, rascher abnahm, als nach Applikation von Nor-Evipan und Methionin. Dies läßt darauf schließen, daß der Abbau (Entmethylierung) des in vivo gebildeten Evipans unter dem Einfluß von Methionin langsamer verläuft als die Entmethylierung des Evipans ohne Methionin. In Abb. 8 ist sowohl die Entmethylierung von Evipan, als auch die Aufmethylierung von Nor-Evipan dargestellt. Es ist daraus zu entnehmen, daß das entmethylierte Evipan (Nor-Evipan) prozentual zum wiedergefundenen Evipan im Verlauf von 120 min auf 50% anstieg, während das durch Aufmethylierung entstandene Evipan im Verhältnis zum wiedergefundenen Nor-Evipan unter dem Einfluß des Methionins annähernd konstant blieb.

Diskussion

Im pharmakologischen Verhalten der Barbitursäuren zeigten sich Unterschiede zwischen N-methylierten und Nor-Barbitursäuren. Dieser Wirkungsunterschied ermöglichte das Studium der Methylierungsvorgänge in vivo. Bereits die Arbeiten von Butler u. Bush haben gezeigt, daß im Organismus eine *Entmethylierung* der N-methyl-Barbitursäuren stattfindet. Eigene Versuche haben

gezeigt, daß die durch Entmethylierung freiwerdenden Methylgruppen durch Übergang auf andere Stoffe deren pharmakologische Wirkung abwandeln. Eine Aufmethylierung von Nor-Adrenalin zu Adrenalin ist durch die N-methyl-Barbitursäuren ebenso möglich wie durch andere Methyldonatoren. Diese Versuche lassen annehmen, daß die bei der Entmethylierung freiwerdenden Methylgruppen in toto, d. h. unzerstört und ohne Zwischenstoffwechsel übertragen werden. Während Bush, Butler u. Dickinson aus Harnanalysen nur eine geringe Entmethylierung von Evipan (etwa 2%) berechnet und der Entmethylierung dieser Verbindung eine untergeordnete Rolle beigemessen haben, zeigen unsere Versuche, daß der Entmethylierung eine größere Bedeutung zukommt. Die Entmethylierung steigt mit der Abnahme der Narkosewirkung an. Zwei Stunden nach der Evipaninjektion, zu einem Zeitpunkt, da die Tiere keine Seitenlage mehr zeigen, vergrößert sich der Anteil der entmethylierten Verbindung auf 50%.

Eine Verstärkung der Narkose nach Barbitursäuren durch Parasympathicomimetica, wie sie Slaughter, Frommel u. Mitarb. fanden, ist nach Ansicht dieser Autoren Folge der Cholinesterasehemmung sie ist nach diesen Autoren jedoch nicht bedingt durch die daraus resultierende innere Acetylcholinämie, sondern durch die vagomimetische Wirkung dieser Stoffe, wobei die Tonisierung des Parasympathicus den Schlaf begünstigt. Greig u. Mayberry fanden ein vermehrtes Eindringen von Diäthylbarbitursäure in das Gehirn nach Physostigmin. Als Ursache nehmen sie eine erhöhte Permeabilität an, als Folge der Cholinesteraseaktivität des Physostigmins.

Unsere Versuchsergebnisse legen die Auffassung nahe, daß eine *Aufmethylierung* der Nor-Barbitursäuren in vivo möglich ist. Diese Tatsache gewinnt Bedeutung für die Erklärung der Wirkungsverstärkung der Barbitursäuren durch gewisse Stoffe. In eigenen Versuchen können wir zeigen, daß Acetylcholin, Physostigmin, Cholin und Methionin die pharmakologische Wirkung der Nor-Barbitursäuren (Pupillenreaktion, Narkosewirkung) zum Wirkungsbild der entsprechenden N-methylierten Barbitursäure abwandeln. Die qualitativ gleichartigen Ergebnisse von Methionin einerseits, Physostigmin, Acetylcholin und Cholin andererseits deuten darauf hin, daß diese Stoffe die Nor-Barbitursäuren aufmethylieren. Die Nor-Barbitursäure ist in ihrer narkotischen Wirkung weniger aktiv, d. h. erst in höherer Dosierung wirksam, als die N-methylierte Form. Aus diesen Ergebnissen wird verständlich, wenn eine Aufmethylierung der Nor-Barbitursäure in vivo durch Methyldonatoren eine Wirkungsverlängerung zur Folge hat. Die papierchromatographischen Blutanalysen sind eine Bestätigung für diese auf Grund pharmakologischer Versuche angenommene Hypothese. Wie Kontrollversuche gezeigt haben, wird durch Zugabe eines Methyldonators vermehrt Evipan aus Nor-Evipan in vivo gebildet. Die Entmethylierung dieses in vivo gebildeten Evipans verläuft unter dem Einfluß von Methionin wesentlich langsamer, als die Entmethylierung von Evipan ohne Methionin. Diese Ergebnisse sprechen

dafür, daß Methionin als Methyldonator das neugebildete Evipan in dieser Form als methylierte Verbindung stabilisiert, während die Entmethylierung verzögert ist.

Zusammenfassung

1. Untersuchungen an der denervierten Pupille von Mäusen haben zum Ergebnis, daß die N-methyl-Barbitursäuren die Pupille erweitern, während die Nor-Barbitursäuren miotisch wirken.

2. Die lokale Cocainwirkung an der denervierten Pupille wird durch die Nor-Barbitursäuren gehemmt. Die N-methyl-Barbitursäuren sind ohne Einfluß.

3. Die N-methyl-Barbitursäuren verstärken die Nor-Adrenalinwirkung an der denervierten Pupille. Diese Verstärkung wird durch Tellur als Methylfänger aufgehoben.

4. Die miotische Wirkung von Nor-Evipan wird durch Stoffe wie Acetylcholin und Cholin in eine Mydriasis umgewandelt. Tellur verhindert diesen Effekt ebenfalls.

5. Die Narkosedauer der Barbitursäuren wird durch Acetylcholin, Cholin, Physostigmin und Methionin verlängert. Die Nor-Barbitursäuren werden durch diese Stoffe in weit stärkerem Maße beeinflußt, als die N-methyl-Barbitursäuren.

6. Eine papierchromatographische Methode wird beschrieben, die den qualitativen und quantitativen Nachweis von Nor-Evipan und Evipan in biologischem Material ermöglicht.

7. Mittels Blutanalysen wird der Nachweis erbracht, daß Evipan in vivo bis zu 50% zu Nor-Evipan demethyliert wird.

8. Eine Aufmethylierung von Nor-Evipan zu Evipan in vivo wird nachgewiesen. Die Aufmethylierung wird unter dem Einfluß von Methionin verstärkt.

Literatur

Algeri, E. J., and J. T. Walker: Amer. J. Clin. Path. **22**, 37 (1952). — Besold: Wien. med. Wschr. **1941**, 697. — Med. Klin. **1942**, 640. — Bester, J. F., and J. W. Nelson: J. Amer. Pharmaceut. Assoc. **42**, 421 (1953). — Bush, M. T., and Th. C. Butler: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **68**, 278 (1940); **72**, 5 (1941). — Bush, M. T., Th. C. Butler and H. L. Dickison: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **108**, 104 (1953). — Butler, Th. C., and M. T. Bush: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **65**, 205 (1939); **69**, 236 (1940). — Butler, Th. C.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **74**, 118 (1942). — Butler, Th. C., D. Mahaffee and C. Mahaffee: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **106**, 364 (1952). — Butler, Th. C.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **108**, 474 (1953). — Deininger, R.: Arch. exp. Path. u. Pharmakol. **222**, 193 (1954); **225**, 127 (1955a). — Arzneimittelforsch. **5**, 472 (1955b). — Emmelin, N.: Schweiz. med. Wschr. **1940**, 1216. — Acta physiol. scand. (Stockh.) **2**, 289 (1941). — Forst, A. W., u. R. Deininger: Klin. Wschr. **1951**, 581. — Arch. exp. Path. u. Pharmakol. **215**, 354 (1952a) —

215 378 (1952b). — Frommel, E. F., u. Mitarb.: Helvet. physiol. Acta **5**, 1, 64, 78, 85, 361 (1947). — Frommel, E. F., Favre and Vallette: Helvet. med. Acta **15**, 314 (1948). — Greig, M. E., and Th. C. Mayberry: J. Pharmakol. a. Exper. Ther. **102**, 1 (1951). — Lamson, P. D., M. E. Greig and B. H. Robbins: Science (Lancaster, Pa.) **110**, 690 (1949). — Lamson, P. D., M. E. Greig and C. J. Hobdy: J. Pharmacol. a. Exper. Ther **103**, 460 (1951). — Lamson, P. D., M. E. Greig and M. Williams: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **106**, 219 (1952). — Richards, R. K., E. L. Bertcher u. J. D. Taylor: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **103**, 359 (1951). — Slaughter, D.: Zit. nach Frommel 1947. — Winter, Ch. A.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **94**, 7 (1948). — Winters, W. P., F. E. Shidemann and J. D. Taylor: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **81**, 576 (1952).

Dr. R. Deininger, München 15, Pharmakol. Institut d. Univ., Nußbaumstr. 28

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 328—341 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. Dr. A. W. Forst)

Über die Wirkung von Flavon- und Cumarinabkömmlingen auf rote Blutkörperchen*

Von
Albert Herz

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Juli 1955)

Eine Reihe von Flavonoiden und Cumarinderivaten vermag die Durchlässigkeit der Capillaren zu verringern; von verschiedenen Autoren wird diesen Substanzen auch die Fähigkeit zugesprochen, die Permeabilität aller Zellgrenzflächen herabzusetzen (Kühnau). Die experimentellen Methoden, die zur Prüfung der Wirkung auf die Capillaren zur Verfügung stehen, sind teilweise recht unbefriedigend. Von Parrot u. Gabe wird angegeben, daß die osmotische Resistenz von Meerschweinchenerythrocyten durch derartige Körper erhöht wird; in diesem Verhalten der roten Blutkörperchen sehen die Autoren eine relativ einfache Möglichkeit, die permeabilitätsvermindernde Wirkung von Substanzen mit sogenanntem Vitamin P-Charakter nachzuweisen.

In Untersuchungen über die Wirkung von Flavon- und Cumarinkörpern auf Meerschweinchenerythrocyten konnten wir ebenfalls Erhöhungen der osmotischen Resistenz beobachten; eine weitere Prüfung ergab aber, daß deren Deutung im Sinne einer Permeabilitätsverminderung oder Strukturverfestigung der Erythrocytenmembran — gegen eine solche sind auch theoretische Bedenken vorzubringen — nicht aufrecht zu halten ist. Um Einblick in die Wirkung dieser Substanzen auf die Erythrocyten, insbesondere ihre Membran zu gewinnen, wurden die Untersuchungen weiter ausgedehnt.

Methodik

Die Versuche wurden vor allem mit Meerschweinchenerythrocyten – einem stark glykolysierenden Blutzellentyp mit hohem Kaliumgehalt — und mit Pferdeerythrocyten — einem schwach glykolysierenden Blutzellentyp mit hohem Kaliumgehalt — durchgeführt. Frisches, defibriniertes Blut wurde mit Tyrodelösung, bzw. Bicarbonat-Glucose-Ringer-Lösung zweimal gewaschen. Entsprechend wurde bei den Versuchen in Kaliummilieu mit phosphatgepufferten Kaliumchloridlösungen vorgegangen (isotone KCl-Lösung 9 Teile, Phosphatpuffer nach Sörensen M/15, p_H 7,4 1 Teil, sowie 0,1% Glucose).

Die Versuche wurden mit den in Tab. 1 verzeichneten Substanzen durchgeführt. Diese Körper (mit Ausnahme der unter C aufgeführten) wurden durch

* Herrn Prof. Dr. Dr. A. W. Forst zum 65. Geburtstag gewidmet.

mehrmaliges Umkristallisieren aus Methanol und Wasser gereinigt. Sie sind teilweise — besonders die Aglykone — bei neutraler und auch schwach alkalischer Reaktion schwer wasserlöslich. Zur Herstellung wäßriger Lösungen wurden die Substanzen zunächst in einer kleinen Menge Methanol gelöst, danach erwärmte Tyrodelösung ohne Bicarbonat (Teillösung I nach MURALT) dazugegeben, das Ganze weiter erhitzt bis zur vollständigen Vertreibung des Methanols, hierauf mit Aqua dest. auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt und nun, nach dem Erkalten, Teillösung II hinzugefügt. Bei den Glykolyseversuchen wurde mit Bicarbonat-Glucose-Ringer-Lösung entsprechend verfahren. In einzelnen der angewandten Konzentrationen blieben einige schwer lösliche Aglykone nicht vollständig in Lösung; darauf wird später jeweils hingewiesen werden. In derartigen Suspensionen war bei weiterer Erhöhung der Konzentration oft eine Wirkungsverstärkung zu beobachten; diese ist wohl durch Adsorption der Verbindungen an die Blutkörperchen und die damit verbundene Möglichkeit der Lösung weiterer Substanz zu erklären. Teilweise wurden auch Suspensionen ohne vorherige Auflösung der Substanz in Methanol verwendet. Bei den in den Tabellen unter C aufgeführten, auf verschiedene Weise leicht wasserlöslich gemachten Körpern — die genaue Konstitution derselben ist nur zum Teil bekannt — waren Lösungen definierter Konzentration ohne weiteres herzustellen. Die Konzentrationsangaben beziehen sich jeweils auf die endgültige im Ansatz vorhandene Substanzmenge.

Bestimmung der osmotischen Resistenz. 1 Teil gewaschenes Blut wurde mit 4 Teilen Tyrodelösung + Glucose vermischt und im Wasserbad bei 38° C inkubiert. Unmittelbar nach dem Mischen, sowie in gewissen Zeitabständen danach wurde die osmotische Resistenz der Erythrocyten in gepufferten Kochsalzverdünnungen bestimmt. Hierbei wurde 1 Teil Erythrocytensuspension zu 10 Teilen Kochsalzverdünnung (isotone NaCl-Lösung 9 Teile, Phosphatpuffer M/15, p_H 7,4 1 Teil; diese Stammlösung ist 0,95 isoton) gegeben, sodann 10 min im Wasserbad stehen gelassen, hierauf die nicht hämolysierten Zellen schnell abzentrifugiert, 15 cm³ der überstehenden Hämoglobinlösung abpipettiert, 10 cm³ Phosphatpuffer M/15, p_H 6,8 dazugegeben; sodann wurde das Hämoglobin mit Ferricyanid in Methämoglobin übergeführt und dieses colorimetrisch (HAVEMANN-Colorimeter) bestimmt.

Alkalibestimmungen. 5 cm³ Erythrocytensuspension wurden nach verschiedenen Inkubationszeiten in Zentrifugengläser pipettiert, 5 min bei 4500 Umdrehungen/min und 13 cm Achsenabstand zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgehoben, der Bodensatz mit 10 cm³ isotoner Kochsalzlösung (für die Kaliumbestimmung) bzw. Kaliumchloridlösung (für die Natriumbestimmung) gewaschen, sodann mit einigen Kubikzentimeter Aqua dest. hämolysiert und das Hämolysat in Platintiegel übergeführt. Die anschließende Veraschung erfolgte nach Trocknung im Wärmeschrank bei 120° C und Zugabe von 0,3 cm³ konz. Schwefelsäure im Muffelofen bei 480° C in Anlehnung an die Methode von RIEBEN. Natrium und Kalium wurden sodann mit dem BECKMAN-Flammenspektrometer bestimmt.

Bei diesem Vorgehen können etwaige Volumänderungen der Erythrocyten während der Inkubation unberücksichtigt bleiben; die errechneten Alkaliwerte beziehen sich auf das Anfangsvolumen (s. auch DAVSON u. DANIELLI, 1938); für die Berechnung des Alkaligehaltes der Meerschweinchenerythrocyten wurde ein Hämatokritwert von 45% zugrunde gelegt.

Glykolyseversuche. Die Messung der Glykolyseaktivität erfolgte manometrisch mit der WARBURG-Apparatur nach den Vorschriften von DIXON. Ansatz: 1 cm³ gewaschenes Blut + 2 cm³ Bicarbonat-Glucose-Ringer-Lösung; Gasphase 95% N_2 + 5% CO_2, Temperatur 37,5° C, Schüttelfrequenz 128/min. Zur Beschleunigung der Sauerstoffaustreibung wurde schon vor Bereitung des Ansatzes N_2-CO_2-Gemisch in die Blutsuspension geleitet; die Durchströmung der Gefäße im Wasserbad

dauerte 10 min; die Ablesungen wurden 30 min nach Bereitung des Ansatzes begonnen und viertelstündlich, später halbstündlich fortgesetzt. Nach anfänglich oft etwas verstärkter Volumenzunahme setzte sich diese in den nicht vergifteten Ansätzen für eine Reihe von Stunden dann meist recht gleichmäßig fort.

Ergebnisse

I. Beeinflussung der osmotischen Resistenz von Meerschweinchenerythrocyten

In Anlehnung an die Versuche von Parrot u. Gabe wurde zunächst Meerschweinchenblut verwendet.

Eine Reihe von Substanzen führte zu einer mehr oder weniger deutlichen, mit der Dauer der Inkubation fortschreitenden Erhöhung der osmotischen Resistenz der Erythrocyten. Zum Teil erfolgte diese Resistenzerhöhung in der Form einer annähernden Parallelverschiebung der Resistenzkurven nach der Seite der höheren Kochsalzverdünnungen hin: die gesamte Erythrocytenpopulation nahm also ziemlich gleichmäßig an der Resistenzerhöhung teil. Bei den schwach wirksamen Körpern kam es meist nur zu einer Abflachung der Resistenzkurve im Bereich der stärkeren Kochsalzverdünnungen; offenbar beschränkte sich hier die Resistenzerhöhung auf einen Teil der Blutkörperchen. Bei weiteren Substanzen endlich trat, trotz Resistenzerhöhung an dem einen Schenkel der Kurve, eine Resistenzverminderung auf der Seite der geringeren Kochsalzverdünnungen in Erscheinung. Dabei war es oftmals so, daß diese meist geringe Resistenzverminderung zu einem früheren Zeitpunkt deutlich wurde als die Resistenzerhöhung und mit dem Fortgang der Inkubation zum Stillstand gelangte, während die Resistenzerhöhung fortschritt. Die Art und Weise der Verteilung der Substanz war nicht ohne Einfluß: bei Verwendung von Suspensionen erreichte die Resistenzerhöhung oft ein größeres Ausmaß als bei den mit Hilfe von Methanol bereiteten Lösungen (s. Tab. 1). Bei einzelnen Substanzen machte sich auch Hämolyse bemerkbar, die jedoch nur bei Morin ein geringes Ausmaß (1—2%) überschritt.

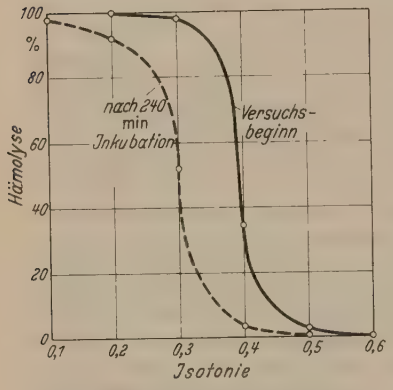


Abb. 1. Erhöhung der osmotischen Resistenz von Meerschweinchenerythrocyten durch Aesculetin 0,2% (suspendiert) während einer Inkubationszeit von 240 min. (In sämtlichen Versuchen liefen unvergiftete Kontrollansätze mit; deren osmotische Resistenz erfuhr während der Versuchszeit meist keine ins Gewicht fallende Veränderung. Die Isotoniewerte sind nicht um den Salzgehalt der zugesetzten Blutkörperchensuspension korrigiert. Dies gilt auch für die folgenden Abbildungen)

Eine annähernd parallele Verschiebung der Resistenzkurven zeigt die folgende Darstellung eines Versuches mit Aesculetin.

Einen Überblick über die Wirkung der verschiedenen Substanzen auf Meerschweinchenerythrocyten gibt die folgende Aufstellung.

Tabelle 1. *Wirkung von Flavon- und Cumarinkörpern auf die osmotische Resistenz von Meerschweinchenerythrocyten*

Den Angaben liegen pro Substanz mindestens zwei, meist aber eine ganze Reihe von Versuchen zugrunde. Die Versuchszeit betrug 180—300 min. Konzentrationsangabe in Klammern = Substanz nicht vollkommen gelöst; S = Suspension ohne vorherige Lösung in Methanol. Provenienz der Substanzen siehe Fußnote.

	Konzentration %	Resistenzerhöhung	Resistenzverminderung
A. *Aglykone*			
Quercetin (a)			
3,5,7,3′,4′-pentahydroxyflavon	0,02	+	(+)
	(0,2) S	+++	(+)
Morin (b)			
3,5,7,2′,4′-pentahydroxyflavon	0,05	(+)	—
	(0,2) S	+	
Myricetin (f)			
3,5,7,3′,4′,5′-hexahydroxyflavon	0,05	(+)	—
	(0,2) S	(+)	(+)
Kaempferol (g)			
3,5,7,4′-tetrahydroxyflavon	0,01	—	—
Hesperetin (h)			
5,7,3′-trihydroxy-4′-methoxyflavanon	0,05	+	—
	(0,1)		
Aesculetin (h)			
6,7-dihydroxycumarin	0,1	++	
	(0,2) S	+++	
B. *Glykoside*			
Rutin (a)			
Quercetin-3-rutosid	0,2	(+)	(+)
Quercitrin (a)			
Quercetin-3-rhamnosid	0,2	(+)	(+)
Kaempferol-3-glucosid (g)	0,2	(+)	—
Hesperidin (d)			
Hesperetin-7-rutosid	0,05	—	—
	(0,1)		
Neo-Hesperidin (c)			
Glucohesperidin + Rhamnose	0,05	—	—
	(0,1)		
Aesculin (d)			
Aesculetin-6-glucosid	0,2	(+)	((+))
	(0,4) S	(+)	—
C. *Gut wasserlösliche Substanzen*			
Hesperidin-Chalcon (d)	0,4	—	
Hesperidin-Methyl-Chalcon (d)	0,4	(+)	
Hesperidin-Phosphat (d)	0,4	—	—
Methylol-Rutin (d)	0,4	(+)	—

Anmerkung. Die Substanzen wurden von folgenden Stellen bezogen oder dankenswerterweise zur Verfügung gestellt: (a) Fa. Theodor Schuchard, München; (b) Fa. C. Merck, Darmstadt; (c) Deutsche Hoffmann-La Roche AG Grenzach; (d) Deutsche Novocillingesellschaft, München-Pasing; (e) Fa. Promonta, Chemische Fabrik, Hamburg; (f) Light & Co Ltd. Colnbrook Bucks. England; (g) Dr. Hänsel, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München; (h) diese Aglykone wurden durch Hydrolyse mit Schwefelsäure aus den Glykosiden gewonnen.

Die Aufstellung zeigt, daß durch einige Flavonoide und die Cumarinabkömmlinge Aesculin und Aesculetin die osmotische Resistenz von Meerschweinchenerythrocyten mehr oder weniger deutlich erhöht wird. (Auf die bei einigen Substanzen angedeutete Verminderung der osmotischen Resistenz wird später eingegangen werden.) Bei dem auch von Parrot u. Gabe untersuchten Rutin und Aesculin war auch bei den hier teilweise angewandten höheren Konzentrationen, die Resistenzerhöhung nur recht klein. Weitere Versuche beschäftigten sich mit der Ursache der Resistenzerhöhung.

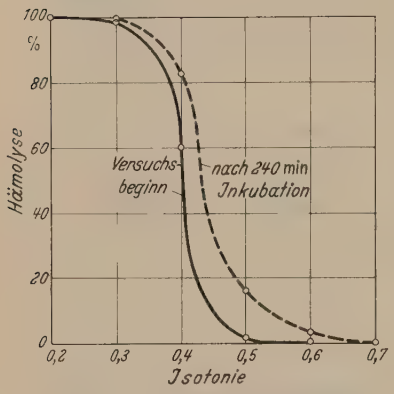


Abb. 2. Verminderung der osmotischen Resistenz von Meerschweinchenerythrocyten durch Aesculetin 0,2% (suspendiert) bei Inkubation im Kaliummilieu (isotone KCl-Lösung 9 Teile, Phosphatpuffer nach Sörensen M/15, p_H 7,4 1 Teil, sowie 0,1% Glucose). Ansatz des Resistenzversuches in entsprechend gepufferten KCl-Verdünnungen; Inkubationsdauer 240 min

Wurde die Inkubation der Erythrocyten in Kaliummilieu vorgenommen, so blieb die Erhöhung der osmotischen Resistenz aus, ja es kam unter Umständen auch zu einer gewissen Erniedrigung derselben. Dies zeigt der folgende Versuch mit Aesculetin.

Meerschweinchenerythrocyten enthalten überwiegend Kalium (siehe folgende Alkalibestimmungen); werden die Blutkörperchen in KCl-Lösung suspensiert, so wird der Konzentrationsgradient für Kalium zwischen Zellinnerem und Außenphase aufgehoben. Bleibt nun eine Erhöhung der osmotischen Resistenz bei Inkubation in KCl-Lösung aus, so weist dies darauf hin, daß der Resistenzerhöhung Kaliumverlust der Zellen zugrunde liegt. Versuche mit Rinder- und Katzenblut sind in gleicher Richtung zu deuten: Aesculetin bewirkte bei Inkubation von Rindererythrocyten in Natriummilieu (Tyrode) nur eine ganz geringe Resistenzerhöhung; bei Katzenblut blieb eine solche vollkommen aus und es kam sogar zu einer geringen Resistenzerniedrigung. Der geringe Konzentrationsgradient für Kalium bei Rindererythrocyten (diese enthalten 22 mÄq. K/l und 79 mÄq. Na/l; Ponder) und sein Fehlen bei Katzenblut (6 mÄq. K/l und 104 mÄq. Na/l; Ponder) erklärt dieses Verhalten ohne Schwierigkeit.

Der unmittelbare Nachweis des Kaliumaustrittes als Ursache der Erhöhung der osmotischen Resistenz war durch Alkalibestimmungen zu erbringen. Die Tab. 2 zeigt die Alkaliverschiebungen bei Meerschweinchenerythrocyten in Tyrodelösung unter der Einwirkung von stark und schwach wirksamen Substanzen.

Tabelle 2. *Veränderung des Kalium- und Natriumgehaltes von Meerschweinchenerythrocyten unter dem Einfluß von Flavon- und Cumarinabkömmlingen*
Der Alkaligehalt bezieht sich auf das Erythrocytenvolumen zu Versuchsbeginn. Mittelwerte aus Doppelbestimmungen und deren Streuung (σ). Konzentrationsangaben wie in Tab. 1.

Substanz	Konzentration %	Inkubationszeit min	Versuchsansatz			Kontrollansatz		
			mÄq. K/l	mÄq. Na/l	K + Na	mÄq. K/l	mÄq. Na/l	K + Na
Quercetin	(0,2) S	1	95,1	13,3	108,4	96,2	10,5	106,7
			± 0,27	± 0,42	± 0,46	± 1,7	± 0,56	± 2,5
		240	64,6	20,6	85,2	99	9,9	108,9
			± 2,6	± 1,5	± 2,8	± 1,3	± 0,28	± 0,31
Aesculetin	(0,2) S	1				93	8,5	101,5
						± 1,4	± 0,28	± 1,7
		210	55	25,1	80,1	95	9,1	104,1
			± 2,8	± 1,1	± 1,7	± 1,1	± 0,92	± 0,03
Hesperetin	(0,1) S	1				103	8,1	111,1
						± 2,1	± 0,03	± 2,2
		240	98	9,7	107,7	104,5	10,3	114,8
			± 2,8	± 0,85	± 3,6	± 0,7	± 0,43	± 1,1
Aesculin	0,4	1	104,2	8,5	112,7			
			± 2,4	± 0,28	± 2,7			
		240	99	7,7	106,7			
			± 1,4	± 0,28	± 1,7			

Unter der Einwirkung von Quercetin und Aesculetin verlieren die Erythrocyten einen beträchtlichen Teil ihres Bestandes an Kalium; dieser Verlust wird nur zum Teil durch Einwanderung von Natrium ausgeglichen. Der osmotisch wirksame Inhalt der Zellen verringert sich dadurch in signifikantem Ausmaß. Die hieraus zu erwartende Erhöhung der osmotischen Resistenz steht in befriedigender Übereinstimmung mit den Versuchen (s. Abb. 1). Die Verminderung des Alkalibestandes der roten Blutkörperchen unter der Einwirkung von Hesperetin und Aesculin ist gering und nicht statistisch gesichert; dem entspricht die nur schwache Wirkung dieser Körper im Osmoseversuch. In den unvergifteten Kontrollansätzen bleibt eine deutliche Alkaliverschiebung ebenfalls aus.

II. Beeinflussung der Glykolyse durch Flavonoide und Cumarine

Von einigen Fermentsystemen ist bekannt, daß sie durch Flavonoide und verwandte Substanzen gehemmt werden (Bartlett; Beiler u. Mitarb. (1950); Beiler u. Martin (1948); Beiler u. Martin (1951);

Gemill; Martin u. Mitarb.; Rodney u. Mitarb.; Uri u. Mitarb.). Teilweise handelt es sich hierbei, wie bei Cholinacetylase und Bernsteinsäuredehydrase, um Sulfhydrilfermente. Es wird in diesen Fällen angenommen, daß die Polyphenolnatur der Oxyflavone, bzw. deren Oxydation zum Chinon für die Hemmung verantwortlich ist (Bartlett: Beiler u. Mitarb., 1950). Es lag daher nahe zu untersuchen, ob durch die uns zur Verfügung stehenden Substanzen die Glykolyse, an der ja ebenfalls SH-Fermente beteiligt sind, beeinträchtigt wird und ob der beobachteten Resistenzerhöhung etwa ein ähnlicher Mechanismus

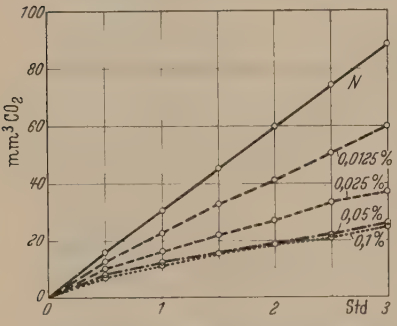


Abb. 3. Hemmung der Glykolyse von Meerschweinchenerythrocyten durch Quercetin; die Zahlen geben dessen endgültige Konzentration an; *N* unvergifteter Ansatz

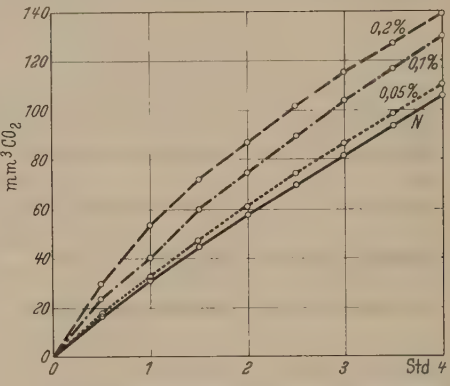


Abb. 4. Steigerung der Glykolyse von Meerschweinchenerythrocyten durch Aesculetin; die Zahlen geben dessen endgültige Konzentration an; *N* unvergifteter Ansatz

zugrunde liegt, wie er von Wilbrandt (1940) und Davson (1941) bei den Glykolysegiften Fluorid und Monojodessigsäure angenommen wird.

Es zeigte sich, daß eine Reihe der untersuchten Substanzen die Glykolyse von Meerschweinchenerythrocyten in ähnlichen Konzentrationen hemmen, in denen sie auch deren osmotische Resistenz verändern.

Die folgende Darstellung gibt einen Glykolyseversuch mit Quercetin wieder.

Einen ähnlichen Verlauf zeigt die Glykolysehemmung bei anderen Substanzen. Die Hemmung nimmt mit der Dauer der Einwirkung auf die Blutkörperchen etwa 1—1½ Std lang zu, um dann einen etwa gleichbleibenden Grad beizubehalten.

Eine ausgesprochene Steigerung der Glykolyse wurde bei Aesculetin beobachtet; dies zeigt der folgende Versuch.

Bei einigen anderen Substanzen ging der Glykolysehemmung in gewissen Konzentrationen manchmal ebenfalls eine meist geringe Glykolysesteigerung voran, oder es wurde bei kleinen Konzentrationen auch eine anhaltende schwache Glykolysesteigerung beobachtet. Einen Überblick über die Beeinflussung der Glykolyse durch die uns zur Verfügung stehenden Körper gibt Tab. 3.

Tabelle 3. *Glykolyse unter dem Einfluß von Flavon- und Cumarinabkömmlingen (unbeeinflußte Glykolyse = 100) in der 3. Std nach Bereitung des Ansatzes*

Mittelwerte aus mindestens zwei Versuchen; die Grenzkonzentrationen der Löslichkeit sind umrandet und deren molare Konzentration, soweit möglich, angegeben. Da der Gehalt an Kristallwasser nur teilweise bekannt ist, wurde bei der Berechnung der molaren Konzentration dieses außer acht gelassen. Um etwa entsprechende molare Konzentrationen zur Deckung zu bringen, sind die Glykoside um eine Spalte verschoben.

	Konzentration				
	0,2 %	0,1 %	0,05 %	0,025 %	0,0125 %
A. *Aglykone*					
Quercetin		22	24	0,82 mM 43	64
Morin	32	45	1,65 mM 73	94	
Myricetin	74	3,1 mM 95	120		
Kaempferol			118	115	0,44 mM 116
Hesperetin	40	3,3 mM 53	66	79	
Aesculetin[1]	11 mM 158	121	102		
	0,4 %	0,2 %	0,1 %	0,05 %	0,025 %
B. *Glykoside*					
Rutin		3,3 mM 61	95	101	
Quercitrin		4,5 mM 59	80	108	
Kaempferol-3-glucosid	62	4,5 mM 66	88		
Hesperidin		107	102	0,82 mM 104	
Neo-Hesperidin		105	1,6 mM 109	102	
Aesculin	11,7 mM 60	84	92		
C. *Gut wasserlösliche Körper*					
	6,6 mM				
Hesperidin-Chalcon	97	105	102		
Hesperidin-Methyl-Chalcon	62	65	81		
Hesperidin-Phosphat	114	112	113		
Methylol-Rutin	95	98			

[1] Die Werte bei Aesculetin geben die Glykolyse in den ersten 90 min der Ablesung wieder.

Bei den erreichbaren Konzentrationen wird die Glykolyse besonders durch einige Aglykone stärker gehemmt[1]. Bei den Glykosiden ist die Wirksamkeit, trotz ihrer besseren Wasserlöslichkeit, geringer. Die Möglichkeit einer für das größere Molekül erschwerten Permeation ist dabei zu berücksichtigen. Ein Vergleich mit Tab. 1 zeigt in der Wirksamkeit der verschiedenen Substanzen gewisse Parallelen. Die gefundene ausgesprochene Glykolysesteigerung durch Aesculetin spricht nicht von vornherein gegen einen Zusammenhang zwischen Glykolysestörung und Resistenzveränderung (Kationenpermeabilitätsveränderung), da auch eine überstürzte Glykolyse als unphysiologisch angesehen werden muß (z. B. verminderter ATP-Gehalt von Erythrocyten unter Einwirkung von Arsenat trotz gesteigerter Glykolyse, Straub).

In weiteren Untersuchungen wurde die Frage eines direkten Zusammenhanges zwischen Glykolysestörung und Kaliumpermeabilitätserhöhung geprüft. Die Resistenzänderung von Meerschweinchenerythrocyten, die mit Kochsalzlösung ohne Glucose mehrmals gewaschen und, zur weiteren Substratverarmung, mehrere Stunden vorinkubiert worden waren, wurde mit der von gut glykolysierenden Erythrocyten verglichen. Die substratverarmten Erythrocyten zeigten nach längerer Inkubation schon ohne Zusatz von Quercetin eine beträchtliche Resistenzerhöhung (Ausbleiben der Kaliumakkumulation?). Durch Quercetin (0,2%, suspendiert) wurde diese aber noch weiter gesteigert und erreichte ein ähnliches Ausmaß wie im Vergleichsversuch mit Quercetin und intakter Glykolyse. In ähnlicher Weise war die Erhöhung der osmotischen Resistenz durch Aesculetin unabhängig davon, ob optimale Glykolysebedingungen gegeben waren oder ob die Glykolyse durch mehrmaliges Waschen und Vorinkubation in glucosefreier Kochsalzlösung fast vollkommen unterbunden war. Daraus geht hervor, daß bei den von uns untersuchten Substanzen eine kausale Verknüpfung von Glykolysehemmung und Resistenzveränderung der Erythrocyten offenbar nicht vorliegt. Durch die im folgenden beschriebenen Versuche mit Pferdeblut, das nur sehr schwach glykolysiert, wird dieses Ergebnis noch unterstrichen.

III. Beeinflussung der osmotischen Resistenz von Pferdeerythrocyten

Das Ergebnis der Versuche mit Pferdeblut wich von dem an Meerschweinchenblut gewonnenen, insofern ab, als hier bei einer Reihe von Substanzen eine ausgesprochene Verminderung der osmotischen Resistenz im Vordergrund stand.

Die beiden folgenden Abbildungen zeigen die Wirkung von Rutin auf Pferdeerythrocyten.

[1] Über die Wirkungssteigerung bei einer über die „einfache Löslichkeit" hinaus erhöhten Konzentration siehe frühere Bemerkung.

Die annähernd parallele Verschiebung der Resistenzkurven (Abb. 5a) zeigt, daß die einzelnen Blutkörperchen ziemlich gleichmäßig an der Resistenzverminderung teilhaben. Diese setzt sehr schnell ein; schon

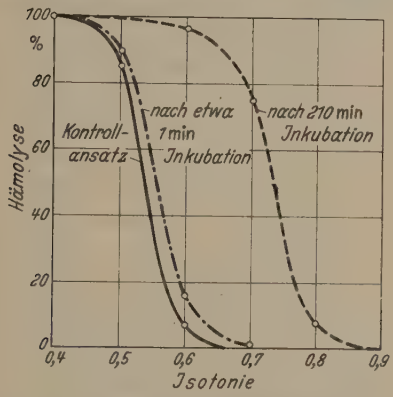


Abb. 5a. Verminderung der osmotischen Resistenz von Pferdeerythrocyten durch Rutin 0,2% nach einer Inkubationszeit von 210 min

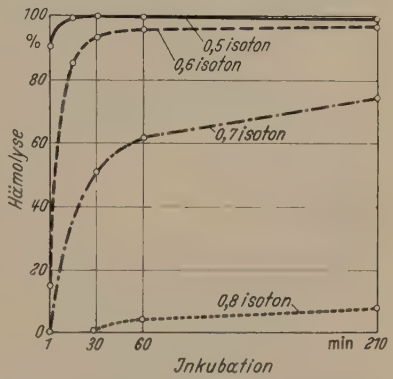


Abb. 5b. Zeitlicher Verlauf der Resistenzverminderung des in Abb. 5a wiedergegebenen Versuches mit Rutin 0,2%

die unmittelbar nach dem Mischen (etwa 1 min Inkubation) gewonnene erste Resistenzkurve ist gegenüber der Kontrolle deutlich verschoben. Der zeitliche Verlauf der Resistenzverminderung wird besonders aus Abb. 5b deutlich; trotz ihres schnellen Eintritts gelangt sie nach ½ bis 1 Std fast vollkommen zum Stillstand.

Eine dem Rutin sehr ähnliche Wirkung zeigten Quercetin, Myricetin und Quercitrin.

Weitere Substanzen führten auch bei Pferdeblut, ähnlich wie bei Meerschweinchenblut, zu einer deutlichen Erhöhung der osmotischen Resistenz; wurden die Versuche in KCl-Lösung durchgeführt, so kam es zu mehr oder weniger deutlicher Resistenzverminderung. Die Abb. 6 gibt den zeitlichen Verlauf der Resistenzänderung unter der Einwirkung von 0,1% Hesperetin in NaCl- (Tyrode) und KCl-Lösung wieder.

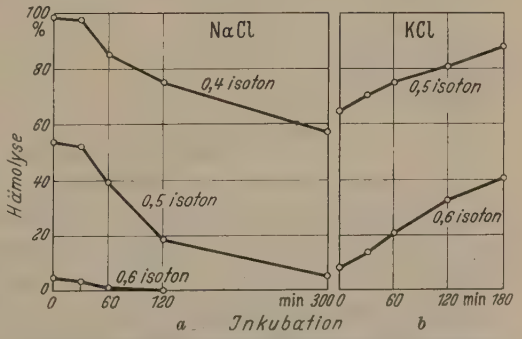


Abb. 6. Zeitlicher Verlauf der Veränderung der osmotischen Resistenz von Pferdeerythrocyten unter der Einwirkung von Hesperetin 0,05%. *a* Resistenzerhöhung in Natriummilieu (Tyrodelösung); *b* Resistenzverminderung in Kaliummilieu (Lösung wie bei Abb. 2 angegeben)

Einen Überblick über die Wirkung der verschiedenen Körper auf Pferdeerythrocyten vermittelt Tab. 4.

Tabelle 4. *Wirkung von Flavon- und Cumarinabkömmlingen auf die osmotische Resistenz von Pferdeerythrocyten*

Inkubationszeit 120—240 min. Konzentrationsangabe in Klammern — Substanz nicht restlos gelöst.

	Konzentration %	Resistenzerhöhung	Resistenzverminderung
A. *Aglykone*			
Quercetin	0,02	—	+++
Morin	0,05	(+)	—
Myricetin	0,05	—	+++
Kaempferol	0,01	—	(+)
Hesperetin	0,05	+	—
	(0,1)		
Aesculetin	0,1	+	((+))
	(0,2)		
B. *Glykoside*			
Rutin	0,2		+++
Quercitrin	0,2	—	+++
Kaempferol-3-glucosid	0,2	—	(+)
Hesperidin	0,05	—	—
	(0,1)		
Neo-Hesperidin	0,05	—	—
	(0,1)		
Aesculin	0,2	+	((+))
C. *Gut wasserlösliche Körper*			
Hesperidin-Chalcon	0,4	(+)	—
Hesperidin-Methyl-Chalcon	0,4	(+)	—
Hesperidin-Phosphat	0,4	—	—
Methylol-Rutin	0,4	—	—

Besprechung der Ergebnisse

Die Untersuchungen an Meerschweinchenerythrocyten zeigen, daß die von einigen Flavon- und Cumarinabkömmlingen hervorgerufene Erhöhung der osmotischen Resistenz auf Kaliumverlust, durch den der osmotisch wirksame Inhalt der roten Blutkörperchen verringert wird, beruht. Mit einer Permeabilitätsherabsetzung oder Strukturverfestigung der Erythrocytenmembran kann diese Resistenzerhöhung daher nicht in Zusammenhang gebracht werden. Wir müssen daher die Ermittlung der osmotischen Resistenz von Erythrocyten als wenig geeignet für die Untersuchung von Substanzen auf sogenannte Vitamin P-Wirksamkeit ansehen.

Eine Erhöhung der osmotischen Resistenz ist bei Einwirkung verschiedener Substanzen auf rote Blutkörperchen beschrieben (z. B. Narkotica). Als Ursache solcher Resistenzerhöhung hält Ponder einen Verlust der Zellen an osmotisch wirksamem Material für wahrscheinlich;

daneben zieht er aber auch in Erwägung, daß durch die Adsorption dieser Körper an die Zellmembran das kritische Hämolysevolumen eine Änderung erfährt. Auf Grund ihres Baues vermag die Erythrocytenmembran osmotischen Kräften keinen nennenswerten Widerstand entgegenzusetzen (Davson u. Danielli, 1952). Hingegen kann unter gewissen Einflüssen — z. B. Formaldehyd (Wilbrandt u. Wyss) — die Geschwindigkeit der Permeation etwa von Wasser verzögert werden; da aber bei der Bestimmung der osmotischen Resistenz das Eintreten eines Gleichgewichtes abgewartet wird, kann eine derartige (dynamische) Veränderung der Permeationsgeschwindigkeit nicht durch Ermittlung eines (statischen) Endgleichgewichtes festgestellt werden.

Wie die von Kleinsorge u. Pohl angegebene, nach intravenöser Injektion von Rutin beim Menschen regelmäßig auftretende Steigernng der osmotischen Resistenz der Erythrocyten zustandekommt, bleibt unklar. Perlick u. Bödecker konnten nach intravenöser Verabfolgung des Roßkastanienpräparates Venostasin, als dessen wirksame Komponente Aesculetin angesehen wird, keine Veränderung der osmotischen Resistenz feststellen; dagegen fanden sie, wie auch Weidenbach, eine Erhöhung der mechanischen Beanspruchbarkeit der Erythrocyten. Für eine solche Prüfung der mechanischen Erythrocytenresistenz gelten aber andere Bedingungen; daher können die Einwendungen gegen eine Prüfung der osmotischen Resistenz nicht ohne weiteres auf jene übertragen werden.

Als Ursache des Kaliumaustrittes bei Meerschweinchenerythrocyten wurde zunächst eine Störung der Glykolyse, ähnlich wie sie von Wilbrandt (1940) und Davson (1941) bei Fluorid und Monojodessigsäure angenommen wird, für möglich erachtet. Die weiteren Untersuchungen ergaben jedoch, daß eine kausale Verknüpfung bei unseren Substanzen nicht vorzuliegen scheint und daß diese unmittelbar auf die Erythrocytenmembran wirken. (Auf Grund neuerer Untersuchungen nehmen Green u. Parpart auch bei Fluorid und Monojodessigsäure eine direkte Beeinflussung der Mempranpermeabilität durch diese Körper an.) Ob bei der Wirkung unserer Substanzen eine Hemmung des aktiven Kaliumtransportes oder eine Erhöhung der passiven Kaliumpermeabilität im Vordergrund steht, läßt sich nicht entscheiden. Die Beobachtungen an substratverarmten Blutkörperchen sprechen zumindest für eine Beteiligung des letzteren Mechanismus. Eine gewisse Ähnlichkeit in der Abstufung von Glykolysestörung und Resistenzerhöhung bei den verschiedenen Substanzen läßt daran denken, daß die gleichen Wirkgruppen der Körper einerseits bestimmte Strukturen der Zellmembran, andererseits an der Glykolyse beteiligte Fermente in Mitleidenschaft ziehen.

Die Untersuchung der Beziehungen zwischen Konstitution einzelner Substanzen und ihrer Beeinflussung der Glykolyse zeigt ähnliche Verhältnisse wie bei der Cholinacetylase (Beiler u. Mitarb., 1950). Bei der Hemmung dieses Fermentes wird die ortho-Enolstruktur des Flavonols, wie auch die ortho-Dioxykonfiguration des Benzolringes als bedeutsam

angesehen; durch Übergang in Chinone sollen die wirksamen Körper entstehen. Die Cholinacetylase ist ein SH-Ferment; da auch an der Glykolyse derartige Enzyme beteiligt sind, ist diese Ähnlichkeit nicht verwunderlich. Die starke Glykolysehemmung durch Hesperetin, das derartige funktionelle Gruppen nicht besitzt, ist auffällig und dürfte mit der Hemmung weiterer an der Glykolyse beteiligter Fermente zusammenhängen.

Der Vergleich zwischen Meerschweinchen- und Pferdeblut zeigt, daß eine Reihe von Substanzen bei beiden Blutarten, in Ausmaß und Verlauf recht ähnliche Resistenzerhöhungen hervorrufen, während die bei Pferdeblut auftretenden, schnell einsetzenden Resistenzverminderungen an Meerschweinchenblut nur angedeutet sind. Eine Reihe der vorher mitgeteilten Beobachtungen deutet darauf hin, daß diese beiden entgegengesetzten Wirkungen nicht verschiedene Phasen eines gleichartigen Mechanismus — etwa einer Kationendurchlässigkeitserhöhung im Sinne einer kolloid-osmotischen Hämolyse (Wilbrandt, 1942) — sind, sondern daß diesen wesentlich verschiedene Ursachen zugrunde liegen, deren eine, unter den Bedingungen — dieser Versuche, eine deutliche Wirkung nur an Pferdeblut entfalten kann. Während die Ursache der Resistenzerhöhung in einem Kaliumverlust zu suchen ist, bedarf der Mechanismus der Resistenzerniedrigung noch der Aufklärung.

Zusammenfassung

Die Beeinflussung der osmotischen Resistenz roter Blutkörperchen durch eine Anzahl Substanzen mit Flavon- und Cumaringerüst wurde untersucht. Hierbei ließen sich zwei Wirkungen voneinander abgrenzen:

1. eine langsam einsetzende, mehr oder weniger deutliche *Erhöhung* der osmotischen Resistenz, die durch eine Reihe von Substanzen bei Meerschweinchen- und Pferdeblut in ähnlicher Weise hervorgerufen wird;

2. eine sehr schnell einsetzende, nach ½—1 Std jedoch fast vollkommen zum Stillstand gelangende *Verminderung* der osmotischen Resistenz, die bei Pferdeblut ausgeprägt, bei Meerschweinchenblut unter den angewandten Versuchsbedingungen aber kaum angedeutet ist.

Die Erhöhung der osmotischen Resistenz tritt nur unter Versuchsbedingungen ein, bei denen ein deutlicher Konzentrationsgradient für Kalium zwischen Zellinnerem und Außenphase vorliegt. Es kommt zu Kaliumverlust der Erythrocyten, der nur teilweise durch Natriumeinwanderung ausgeglichen wird, so daß der osmotisch wirksame Inhalt der Zellen abnimmt. Ein Zusammenhang mit einer Permeabilitätsverminderung oder Strukturverfestigung der Erythrocytenmembran besteht nicht: die Ermittlung der osmotischen Resistenz ist daher nicht geeignet zur Prüfung von Substanzen auf sogenannte Vitamin P-Wirksamkeit.

Ein Teil der Flavon- und Cumarinabkömmlinge beeinflußt die Glykolyse von Meerschweinchenerythrocyten. Ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Glykolysehemmung und Kaliumpermeabilität, wie er teilweise bei anderen Glykolysegiften angenommen wird, ist bei unseren Substanzen nicht nachzuweisen. Die Körper wirken unmittelbar auf die Membran der roten Blutkörperchen. Beziehungen zwischen Glykolysehemmung und der Konstitution der Substanzen werden besprochen.

Literatur

Bartlett, G. R.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **93**, 329 (1948). — Beiler, J. M., R. Brendel, M. Graff and G. J. Martin: Arch. of Biochem. **26**, 72 (1950). — Beiler, J. M., and G. J. Martin: J. of Biol. Chem. **174**, 31 (1948); **192**, 831 (1951). — Davson, H.: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **18**, 173 (1941). — Davson, H., and J. F. Danielli: Biochemic. J. **32**, 991 (1938). — The Permeability of Natural Membranes, 2nd Edition, Cambridge 1952. — Dixon, M.: Manometric Methods, Cambridge 1951. — Gemill, C. L.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **96**, 166 (1949). — Green, J. W., and A. K. Parpart: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **42**, 191 (1953); Ref. Ber. ges. Physiol. 166, 219. — Kleinsorge, H., u. W. Pohl: Z. inn. Med. 8, 326 (1953). — Kühnau, J.: Mercks Ber. **61—62**, 8 (1947—48). — Martin, G. J., M. Graff, R. Brendel and J. M. Beiler: Arch. of Biochem. **21**, 177 (1949). — v. Muralt, A.: Praktische Physiologie, Berlin-Heidelberg 1948. — Parrot, J. L., et M. Gabe: C. r. Soc. Biol. (Paris) **141**, 362 (1947). — Perlick, E., u. H. Bödecker: Münch. med. Wschr. **1951**, 1465. — Ponder, G.: Hemolysis and Related Phenomena. New York 1948. — Rieben, W. K.: Über die Kaliumbestimmung in biologischer Substanz. Basel 1947. — Rodney, G., L. Swanson, L. M. Wheeler, G. N. Smith and C. S. Worrel: J. of Biol. Chem. **183**, 739 (1950). — Straub, F. B.: Acta physiol. (Budapest) **4**, 235 (1935). — Uri, J., S. Koroszy u. S. Scéplaki: Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. **1**, 137 (1947). — Weidenbach. W.: Chirurg **23**, 507 (1952). — Wilbrandt, W.: Pflügers Arch. **243**, 519 (1940); **245**, 22 (1942). — Wilbrandt, W., u. H. U. Wyss: Helvet. physiol. Acta **5**, 457 (1947).

Dr. Albert Herz, Pharmakol. Institut d. Univ. München, Nußbaumstr. 28

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 342—351 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. Dr. A. W. Forst)

Über den Einfluß des Carotissinus auf die Durchblutung des Skeletmuskels* **

Von
Wolfgang Felix

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. Juli 1955)

Als ich bei den Versuchen über die Wirkung des Carotissinus auf die Muskelleistung [W. Felix (2)] die Durchblutung des Muskels kontrollierte, fiel mir auf, daß die Muskelgefäße sich zunächst erweitern und dann kontrahieren, nachdem der endosinuale Druck gesenkt wurde. So schien mir die Dilatation der eigentliche Erfolg einer Druckverminderung im Carotissinus zu sein. Dies widerspricht aber den Mitteilungen von C. Heymanns u. J. Bouckaert; A. Jarisch; H. Rein; H. Rein u. O. Mertens; H. Rein u. M. Schneider; D. Schneider; A. Tournade u. J. Malméjac; L. Binet u. M. Burstein; und McDowall. Diese Autoren beschreiben, daß mit einer Senkung des endosinualen Druckes sich die Muskelgefäße verengen. Da aber in meinen Versuchen dieser Konstriktion fast regelmäßig eine Dilatation voranging, untersuchte ich, ob die Verminderung des endosinualen Druckes nicht doch eine Dilatation dieser Gefäße bewirkt und ob es sich bei der Konstriktion nicht bereits um eine Gegenregulation handelt.

Methodik

40 Versuche wurden an Katzen in Chloralose-Urethan-Narkose durchgeführt (30—40 mg/kg Chloralose, 100 mg/kg Urethan per os). Zur Kontrolle wurden 6 Katzen mit Barbituraten narkotisiert (Pernocton, Evipan, Thiogenal). Die Narkose wurde hierbei mit Äther eingeleitet und das Barbiturat anschließend i.v. injiziert. Es wurde der Einfluß des Carotissinus auf die Durchblutung der hinteren Extremität untersucht. In den Vasa femoralia wurde der arterielle Zu- und der venöse Abfluß sowie die Strömungsdifferenz zwischen beiden mit Thermistoren gemessen (W. Felix u. H. Groll (1) W. Felix (3)]. Mit Broemserschen Glasplattenmanometern wurden der Systemdruck in der A. femor. und der Druck im Carotissinus seitenständig registriert. In einer Reihe von Versuchen wurde der endosinuale

* Herrn Prof. Dr. Dr. A. W. Forst zum 65. Geburtstag gewidmet.

** Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Sie wurde auszugsweise auf dem Kongreß der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft (1954) vorgetragen [W. Felix (4)].

Druck durch Abklemmen beider Carotiden gesenkt, in den übrigen Versuchen auf folgende Art: Das Blut aus beiden Carotiden wurde über ein T-Stück vereint. Das vereinte Blut lief durch ein kurzes Schlauchstück, an welchem eine Mikrometerschraube angebracht war, und anschließend durch ein zweites T-Stück, in dessem seitlichen Ansatz der endosinuale Druck gemessen wurde. Danach wurde es über ein drittes T-Stück geteilt und wieder in die Carotiden zurückgeleitet. Mit Hilfe der Mikrometerschraube konnte der endosinuale Druck um einen beliebigen Betrag langsam oder schnell gesenkt und wieder erhöht werden. Die Aortennerven wurden nicht durchtrennt.

In mehreren Versuchen wurde die Extremität von einem Spendertiere durchblutet. A. u. V. femor. von Spender und Empfänger wurden durch Kunststoffschläuche verbunden und in diesen wurde die Strömung gemessen. Am Empfänger wurden die Oberschenkeläste der Vasa femor. von der Lacuna vasorum bis zur Mitte des Oberschenkels unterbunden, um eine Verbindung zwischen Spender- und Empfängerblut möglichst einzuschränken. In 3 Versuchen wurde zur Kontrolle die gesamte Oberschenkelmuskulatur durchtrennt.

Mit der angewandten Methodik wurde die Strömung in der gesamten Extremität registriert, also einschließlich der Hautdurchblutung. Der Einfluß der Hautdurchblutung wurde vernachlässigt. Dadurch können über die Muskeldurchblutung nur qualitative Aussagen gemacht werden.

Ergebnisse

Versuche in Chloralosenarkose (Abb. 1—3). Wenn der endosinuale Druck sinkt, wird sowohl die eigen- als auch die fremddurchblutete Extremität zunächst vermehrt durchströmt. In der fremddurchbluteten Extremität (Abb. 2) wird diese Hyperämie ausschließlich durch eine Dilatation verursacht, weil der Blutdruck des Spendertieres sich nicht ändert. In der eigendurchbluteten Extremität (Abb. 1) wird sie ebenfalls durch eine Dilatation hervorgerufen. Da aber hier der Blutdruck steigt, wird auch durch ihn die Strömung vermehrt. Jedoch ist der Anstieg so gering, daß sein Anteil an der Hyperämie nur klein sein kann. Außerdem nimmt die Strömung auch dann noch fast unvermindert zu, nachdem der Blutdruck nicht mehr steigt, ja sogar geringfügig sinkt. Im Gegenteil, man darf annehmen, daß der Systemdruck deshalb nur wenig steigt, weil die Muskelgefäße sich so stark erweitern.

In der Regel bleiben die Gefäße nicht während der ganzen Dauer der Verminderung des endosinualen Druckes erweitert (Abb. 2). Nach 10—30 sec beginnen sie sich wieder zu kontrahieren. Diese Konstriktion ist aber nicht so stark, daß die Strömung in der eigendurchbluteten Extremität, in welcher der Systemdruck erhöht ist, bis unter die Ausgangslage absinkt. In der fremddurchbluteten Extremität ist der Blutdruck (des Spendertieres) nicht erhöht. Darum reicht hier die Stärke der Konstriktion aus, um die Strömung bis zur Ausgangslage und darunter zu vermindern (Abb. 2). Da die Konstriktion erst sekundär auftritt, handelt es sich vermutlich um eine Gegenregulation.

Wenn der sinkende endosinuale Druck die Muskelgefäße erweitert, so muß der steigende sie verengen. Sie kontrahieren sich aber nur dann

deutlich, wenn sie durch die vorangehende Gegenregulation nicht ohnehin schon verengt sind. Um die primäre konstriktorische Wirkung nachzuweisen, muß der endosinuale Druck erhöht werden, bevor die Gegenregulation einsetzt, wie Abb. 1 zeigt. Hier verengt die Druckerhöhung die Gefäße stark, so daß die Strömung erheblich zurückgeht. Der Anteil des sinkenden Systemdruckes an dem Rückgang der Strömung ist auch jetzt wieder sehr gering. Nur in dem Augenblick, in welchem der Blutdruck nach Erhöhung des endosinualen Druckes um wenige Millimeter Hg abfällt, wird die Strömung druckpassiv vermindert. Nachdem die Strömung nachgelassen hat, beginnt sie neuerdings zu steigen. Sekundär erweitern sich also die Gefäße. Wie bei der Senkung des endosinualen

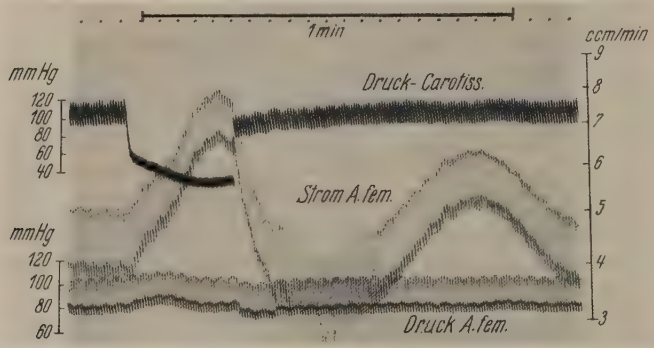


Abb. 1. Chloralosenarkose. Eigendurchblutete Extremität. Schnelle Senkung und Erhöhung des endosin. Druckes nach etwa 1stündiger Versuchsdauer. Die Unregelmäßigkeit in der Strömungskurve der A. femor. zwischen Rückgang und neuerlichem Anstieg wurde dadurch versucht, daß die Strömung unter den Meßbereich der Stromuhr zurückging

Druckes die primäre Dilatation von der sekundären Konstriktion verdrängt wird, so folgt entsprechend bei seiner Erhöhung auf die primäre Konstriktion eine sekundäre Dilatation.

Wenn man beide Carotiden abklemmt, wird der endosinuale Druck binnen kurzer Zeit auf 20—50 mm Hg gesenkt, und mit dem Öffnen der Carotiden schnellt der Druck innerhalb eines Bruchteiles einer Sekunde auf die Ausgangslage zurück, bzw. darüber hinaus auf die Höhe des reflektorisch angestiegenen Systemdruckes. Derart große, schnell erfolgende Druckschwankungen kommen normalerweise nicht vor. Sie bewirken abnorm starke Reaktionen, welche ihrerseits Gegenregulationen auslösen. Im Versuch der Abb. 3 (fremddurchblutete Extr.) sinkt der endosinuale Druck langsam auf 60 mm Hg. Die Gefäße erweitern sich und kontrahieren sich sekundär nur schwach. Wenn in sehr flacher Narkose der endosinuale Druck aber nur um wenige Millimeter Hg gesenkt wird, dann erweitern sich die Gefäße und bleiben erweitert, bis der Druck wieder erhöht wird. Eine sekundäre Konstriktion tritt dann nicht auf. Während

die Gefäße sich nach jeder Art von Drucksenkung im Carotissinus erweitern, kontrahieren sie sich sekundär nur dann, wenn der endosinuale Druck schnell und stark sinkt. Darum muß der eigentliche Erfolg einer Druckverminderung im Carotissinus die Dilatation der Muskelgefäße sein, und es kann sich bei der sekundären Konstriktion nur um eine Gegenregulation handeln.

Auf welche Weise und an welcher Stelle die Gegenregulation ausgelöst wird, kann ich nicht sagen. Wahrscheinlich spielen hierbei auch die Pressoreceptoren am Aortenbogen und an der Subclavia eine Rolle (die Aortennerven wurden nicht durchtrennt).

Ich vermute, daß sich die Gefäße in allen Skeletmuskeln an diesen Reaktionen beteiligen. Dafür spricht vielleicht ein Versuch, bei dem die Strömung in einer eigen- und in einer fremddurchbluteten Extremität gleichzeitig gemessen wurde. Nach Senkung des endosinualen Druckes war die primäre Dilatation so stark, daß der Systemdruck sogar sank statt anzusteigen. Die Dilatation in der fremddurchbluteten Extremität allein genügte aber nicht, um den Systemdruck des Spendertieres sichtbar zu senken. (Eine derart starke Dilatation kam nur dieses eine Mal vor.)

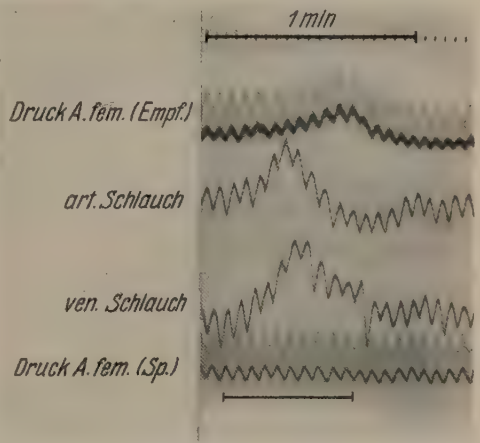


Abb. 2. Chloralosenarkose. Fremddurchblut. Extrem. Während der Marke: Abklemmen der beiden Carotiden nach etwa 3 stündiger Versuchsdauer. Strömungsmessung mit langsam reagierenden Thermistoren. *Empf.* Empfänger, *Sp.* Spender

Form der Mehrdurchblutung. Wie die Messung der arteriovenösen Strömungsdifferenz (7 Versuche in Chloralosenarkose) ergibt, wird vermutlich die Hyperämie bei niedrigem endosinualen Druck nicht durch die Dilatation aller Gefäße in einem Muskel hervorgerufen. Bei Senkung des endosinualen Druckes ändert sich nämlich die Kurve der a.v. Stömungsdifferenz nicht oder nur wenig (Abb. 3). (Beim Überwiegen der arteriellen Strömung weicht die Kurve nach oben ab und nach unten beim Überwiegen der venösen.) Arterielle und venöse Strömung nehmen also etwa gleichzeitig zu. Manchmal steigt die venöse sogar ein wenig vor der arteriellen an (Abb. 2, 3). Wenn arterielle und venöse Strömung gleichzeitig zunehmen, kann die zusätzliche Blutmenge, welche zu Beginn in der Vene fließt, nicht von der Arterie zugeführt worden sein. Denn in diesem Falle würde die venöse Strömung nicht gleichzeitig mit der arteriellen, sondern nach dieser ansteigen. Damit aber venöse und arterielle Strömung gleichzeitig zunehmen können, muß die Peripherie der Vene

Blut zuführen. Ein Teil der peripheren Strombahn muß sich also kontrahieren. Hierbei kann es sich nicht um die venösen Capillaren oder Venolen handeln, da sie sich erweitern, um dem vermehrten arteriellen Zufluß keinen Widerstand zu bieten. Ich vermute, daß venöse Kollateralen und Anastomosen sich verengen und Blut auspressen. So wird durch diese Form der Mehrdurchblutung einmal die Muskulatur besser durchblutet und dadurch zu erhöhter Leistung befähigt und außerdem überschüssiges Blut an den Kreislauf abgegeben („Arbeitshyperämie").

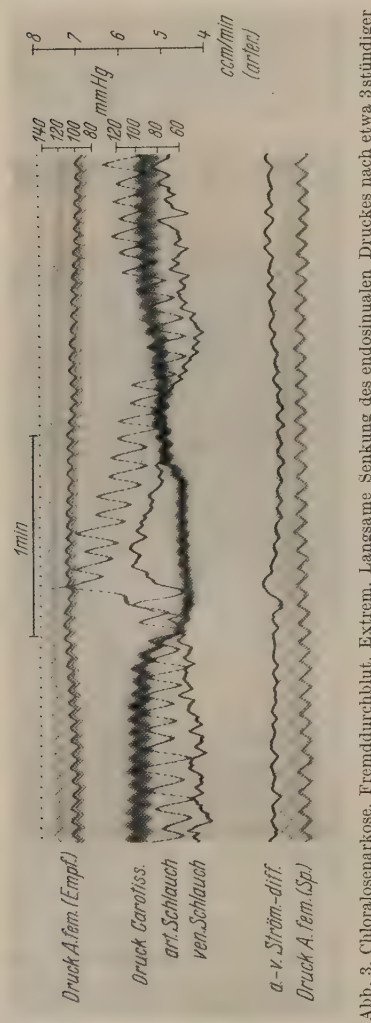


Abb. 3. Chloralosenarkose. Fremddurchblut. Extrem. Langsame Senkung des endosinualen Druckes nach etwa 3stündiger Versuchsdauer. Strömungsmessung mit langsam reagierenden Thermistoren. *Empf.* Empfänger, *Sp.* Spender

Inwieweit hierbei die Hautdurchblutung eine Rolle spielt, welche bei der angewandten Methodik mitbestimmt wurde, kann noch nicht gesagt werden. Darum seien diese Befunde nur mit Vorbehalt mitgeteilt. Die beschriebenen Versuche wurden an der „ruhenden Extremität" ausgeführt. Über ein ähnliches Verhalten am arbeitenden Muskel wird noch zu berichten sein.

Versuche in Barbituratnarkose (Abb. 4, 5). Hier gilt prinzipiell dasselbe, wie bei den Versuchen unter Chloralose, solange die Narkose oberflächlich ist und die Senkung des endosinualen Druckes zu Beginn des Versuches durchgeführt wird. Die primäre Dilatation und die primäre Konstriktion nach Senkung und Erhöhung des endosinualen Druckes lassen mit zunehmender Narkosetiefe und Versuchsdauer sehr schnell an Stärke nach und fehlen schließlich ganz. Wenn die Narkose schon von Anfang an nicht flach genug ist, sind sie auch zu Versuchsbeginn nicht zu beobachten. Dagegen treten die sekundären Reaktionen mit zunehmender Versuchsdauer und Narkosetiefe stärker in Erscheinung, im Gegensatz zu den Versuchen unter Chloralose.

Im Versuch der Abb. 4 wurde der endosinuale Druck etwa 1 Std und im Versuch der Abb. 5 etwa 4 Std nach Narkoseeintritt am gleichen Tier

gesenkt. Die Narkose war von Anfang an nicht sehr flach. Zu Versuchsbeginn (Abb. 4) erweitern sich die Gefäße nur wenig, nachdem der endosinuale Druck gesenkt wurde. Sehr bald darauf kontrahieren sie sich gerade so stark, daß die Strömung bis zur Ausgangslage vermindert wird. Mit der Erhöhung des Carotissinusdruckes sinkt der Systemdruck und die Strömung geht zurück. Dieser Rückgang der Strömung ist vielleicht etwas zu stark, als daß er nur druckpassiv bedingt sein könnte. Wahrscheinlich kontrahieren sich die Gefäße schwach. So sind die primäre Dilatation und die primäre Konstriktion in diesem Versuch noch nach-

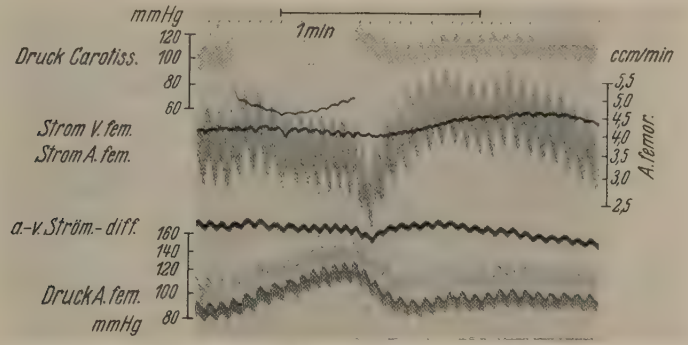


Abb. 4. Pernoctonnarkose. Eigendurchblut. Extrem. Gleiches Tier wie Abb. 5. Schnelle Senkung und Erhöhung des endosin. Druckes nach etwa 1stündiger Versuchsdauer. Wie auch in Abb. 5 ist die Musterung in der Strömungskurve der A. femor. durch Eigenschwingungen des Spiegelgalvanometers (Eigenfrequ. 50 Hz) verursacht

zuweisen. Nach längerer Versuchsdauer (Abb. 5) ist dies nicht mehr möglich. Bei der Senkung des endosinualen Druckes kontrahieren sich die Gefäße sehr bald so stark, daß die Strömung erheblich unter die Ausgangslage zurückgeht, was unter Chloralose nicht vorkommt. Die venöse Strömung hinkt träge der arteriellen nach, ebenfalls im Gegensatz zu den Versuchen unter Chloralose.

Barbiturate erweitern bekanntlich die Gefäße. Diese dilatatorische Wirkung wird durch Gegenregulationen wieder aufgehoben. Möglicherweise besteht daher in Barbituratnarkose eine gewisse Tendenz zur Konstriktion, und vielleicht ist aus diesem Grunde die sekundäre Konstriktion nach Senkung des endosinualen Druckes in etwas tieferer Narkose derart stark.

Verhalten des Systemdruckes nach schneller Senkung des endosinualen Druckes. Wenn der endosinuale Druck zu Versuchsbeginn und in sehr flacher Chloralosenarkose (Abb. 1) gesenkt wird, steigt der Systemdruck schnell an, obwohl gleichzeitig der periphere Widerstand in der Muskulatur durch die Dilatation nachläßt. Wegen der starken Dilatation ist der Anstieg aber nur gering. Mit der Erhöhung des endosinualen Druckes fällt der Systemdruck mit dem nächsten Pulsschlag auf seine Ausgangshöhe zurück.

Nach etwa 3stündiger Versuchsdauer und weniger oberflächlicher Chloralosenarkose (Abb. 2) nimmt der Blutdruck erst dann wesentlich zu, nachdem die primär erweiterten Gefäße sich wieder verengen. Die Herzbeschleunigung und die Konstriktion in anderen Gefäßgebieten reichen nicht aus, um den Blutdruck zu erhöhen, solange die Muskelgefäße erweitert sind. Er steigt darum langsam an, ähnlich wie im Versuch der Abb. 4 unter Pernocton. Mit der Erhöhung des endosinualen Druckes sinkt er etwas schneller, als er angestiegen war.

Nach etwa 4stündiger Versuchsdauer in Pernoctonnarkose (Abb. 5) erweitern sich die Muskelgefäße nach Senkung des endosinualen Druckes

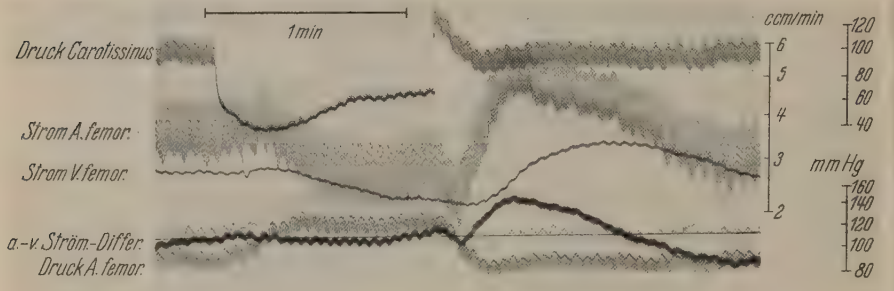


Abb. 5. Pernoctonnarkose. Eigendurchblut. Extrem. Gleiches Tier wie in Abb. 4. Schnelle Senkung und Erhöhung des endosin. Druckes nach etwa 4stündiger Versuchsdauer

nicht mehr nachweisbar, sondern kontrahieren sich bald sehr stark. Deshalb steigt jetzt der Blutdruck wieder schnell und erheblich an. So täuscht ein Versuch wie in Abb. 5 eine gute Reaktion der Kreislaufreflexe vor.

Einfluß der Narkose. Die Pressoreceptoren senden nur hemmende Impulse aus [H. E. Hering, Eb. Koch (3)]. Wenn diese hemmenden Impulse durch eine Senkung des endosinualen Druckes vermindert werden oder ganz wegfallen, werden die bekannten Reaktionen (Blutdruckanstieg, Adrenalinausschüttung usw.) dadurch nicht verursacht, sondern nur ermöglicht. Es muß ein Erregungszustand bestehen, welcher diese Reaktion auslöst. Dieser Tonus wird durch die Narkose beeinflußt. Die Wirkung der Narkose zeigt aber, daß es sich nicht um einen gemeinsamen Tonus für alle diese Reaktionen handeln kann. Denn mit zunehmender Narkosetiefe werden die Vorgänge, welche bei einer Senkung des endosinualen Druckes auftreten, nicht mit gleicher Stärke gelähmt. Der reflektorische Druckanstieg ist auch in tiefer Narkose vorhanden. Nach E. Koppermann, W. Brendel u. R. Thauer wird er durch Barbiturate erst in tiefster Narkose gelähmt, während ihn Chloralose auch dann noch nicht beeinflußt. Demgegenüber tritt die Dilatation der Muskelgefäße

nur in flacher Narkose auf. Diese Reaktion wird durch Barbiturate ebenfalls schneller gelähmt als durch Chloralose. Auch andere Reaktionen, z. B. die Leistungssteigerung des Skeletmuskels bei niedrigem endosinualen Druck [W. Felix (2)], werden durch die Narkose leicht beeinflußt. Es muß also wenigstens zwischen einem auf Narkose sehr empfindlichen und einem hierauf verhältnismäßig unempfindlichen Tonus unterschieden werden.

Chloralose beeinträchtigt die beschriebenen Reaktionen bei weitem nicht so stark wie die Barbiturate. Jedoch darf auch aus den Versuchen unter Chloralose nicht ohne weiteres auf den wachen Zustand geschlossen werden, selbst bei sehr oberflächlicher Narkose. Gerade hier erwecken die Versuche den Eindruck, daß die primäre Dilatation zu stark ist. Denn der Systemdruck steigt reflektorisch sehr wenig an. Vielleicht wird schon in flacher Narkose ein Tonus (parasymp.?) gelähmt, welcher der Dilatation entgegen wirkt.

Das Narkoticum wurde nur einmal gegeben (Chloralose per os, Barbiturate i.v.), also während des Versuches nicht mehr. Mit zunehmender Versuchsdauer wurde die Narkose zunächst tiefer und späterhin dann wieder flacher. Welche weiteren Veränderungen mit zunehmender Versuchsdauer auftreten und welche Faktoren hierbei eine Rolle spielen (operat. Eingriff usw.), überblicke ich nicht. Versuchsdauer und Narkosetiefe sind also nicht unbedingt gleichbedeutend. Nach der Einteilung von E. Koppermann, W. Brendel und R. Thauer befanden sich die Tiere stets nur in „sehr flacher" oder „flacher" Narkose.

Besprechung

Mit sinkendem endosinualen Druck werden die Muskelgefäße weiter und mit steigendem enger. Diese Wirkung wird mit zunehmender Narkosetiefe schwächer und ist, besonders in Barbituratnarkose, schließlich nicht mehr nachzuweisen. Wenn der endosinuale Druck schnell und stark gesenkt wird, wie dies beim Abklemmen beider Carotiden der Fall ist, wird die primäre Dilatation von einer Gegenregulation verdrängt. Diese sekundäre Konstriktion wird von der Narkose weniger stark beeinflußt. In etwas tieferer Barituratnarkose scheint sie sogar verstärkt zu sein. Je nach Narkosetiefe und -art kann darum auf eine schwache, kurzdauernde Dilatation eine so deutliche Konstriktion folgen, als sei diese die eigentliche Wirkung der Drucksenkung im Carotissinus. Ich glaube, daß hierdurch die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der genannten Autoren und den eigenen erklärt werden. Diese Autoren senkten den endosinualen Druck durch Abklemmen der Carotiden, so daß er binnen kurzer Zeit erheblich abfiel. Möglicherweise war auch die Narkose nicht oberflächlich genug. Darum mag die primäre Dilatation, soweit sie überhaupt auftrat, nur schwach gewesen sein, und die nachfolgende Konstriktion wurde als die eigentliche Wirkung angesehen.

Von H. Rein, H. Rein u. O. Mertens, H. Rein u. M. Schneider sowie D. Schneider wurde die Wirkung des Carotissinus auf die Muskelgefäße besonders eingehend untersucht. Die Versuche wurden an Hunden

in Narkose mit Numal-Chloralose, Chloralose-Morphin und Pernocton-Morphin durchgeführt. Bei diesen Narkosen ist meines Erachtens eine deutlich erkennbare primäre Dilatation kaum zu erwarten. Immerhin müßte sie aber wenigstens andeutungsweise zu sehen sein. Das ist in einer Reihe der veröffentlichten Kurven auch der Fall, z. B. in der Abb. 8 (A. femor. dextr.) der Mitteilung von D. Schneider, besonders bei der zweiten Senkung des endosinualen Druckes. Die von H. Rein (1) beschriebene Entlastungsreaktion bei Öffnung der Carotiden bobachteete ich nicht.

Die Dilatation der Muskelgefäße nach Senkung des endosinualen Druckes läßt sich mit den Vorgängen, welche der Carotissinus veranlaßt bzw. hemmt, durchaus vereinbaren. Sie wird nicht nur nerval, wie die Versuche an der fremddurchbluteten Extremität zeigen, sondern auch humoral bewirkt. Denn bei niedrigem endosinualen Druck wird vermehrt Adrenalin ausgeschüttet [C. Heymans (2), A. N. Richards u. W. G. Wood], und dieses erweitert die Muskelgefäße (J. Doerner). Ferner handelt es sich um eine Form der Hyperämie, bei welcher wahrscheinlich nicht alle Gefäße dilatiert sind. Teile der venösen Strombahn, welche für den erhöhten Durchfluß nicht notwendig sind, kontrahieren sich vermutlich und geben Blut an den Kreislauf ab, ebenso wie sich auch die Blutdepots entleeren. Diese Hyperämie erhöht die Leistungsfähigkeit. Tatsächlich leistet der elektrisch gereizte Muskel bei niedrigem endosinualen Druck auch vermehrt Arbeit, da die Erregbarkeit der motorischen Bahnen erhöht ist [W. Felix (2)]. Spontan und reflektorisch ausgelöste Muskelbewegungen werden verstärkt (E. Koch, A. S. Wright, V. Spychala). Die beschriebenen Reaktionen der Muskelgefäße sind ein Teil der „Irradiation der pressoreceptorischen Kreislaufreflexe" [E. Koch (1)]. Im Sinne von W. R. Hess handelt es sich hierbei allerdings nicht um eine Irradiation, sondern um eine Koordination.

E. Koch (1) zufolge ist der Carotissinusreflex ein Schutzreflex, welcher den Kreislauf vor zu starker Beanspruchung auch dadurch bewahrt, indem er die Ursache für die Überanspruchung abschwächt oder beseitigt. Denn der Carotissinus hemmt die mit erhöhtem Energieverbrauch gekoppelten Reaktionen [E. Koch (1)]. Wenn die hemmenden Impulse des Carotissinus wegfallen, können die energieverbrauchenden Muskeln mehr leisten. Deshalb werden die Muskelgefäße weiter, wenn der endosinuale Druck sinkt.

Zusammenfassung

An Katzen in Chloralose- und in Barbituratnarkose wurde der Einfluß der Pressoreceptoren des Carotissinus auf die Durchblutung der hinteren Extremitäten untersucht. Bei sinkendem endosinualen Druck erweitern sich die Muskelgefäße und bei steigendem verengen sie sich.

Wenn der endosinuale Druck stark verändert wird, setzen Gegenregulationen ein. Die primären Reaktionen werden durch die Narkose (besonders Barbiturate) leicht beeinflußt.

Literatur

Binet, L., et M. Burstein: C. r. Soc. Biol. (Paris) **141**, 248 (1947). — Doerner, J.: Pflügers Arch. **257**, 464 (1953). — McDowall, R. J. S.: J. of Physiol. **111**, 1 (1950). — Felix, W., u. H. Groll (1): Z. Biol. **106**, 208 (1950). — Felix, W. (2): Z. Biol. **107**, 308 (1954). — Felix, W. (3): Z. Biol. im Druck. — Felix, W. (4): Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 152 (1954). — Hering, H. E.: Die Karotissinusreflexe auf Herz und Gefäße. Dresden u. Leipzig 1927. — Hess, W. R.: Die funktionelle Organisation des vegetativen Nervensystems. Basel 1948. — Heymans, C., et J. Bouckaert (1): C. r. Soc. Biol. (Paris) **104**, 336 (1930). — Heymans, C. (2): Klin. Wschr. **1930**, 673. — Jarisch, A.: J. of Physiol. **60**, 419 (1925). — Koch, E. (1): Klin. Wschr. **1932**, 225. — Koch, E. (2): Z. Kreislaufforsch. **1932**, 25. — Koch, E. (3): Die reflektorische Selbststeuerung des Kreislaufes. Dresden u. Leipzig 1932. — Koppermann, E., W. Brendel u. R. Thauer: Pflügers Arch. **260**, 239 (1955). — Richards, A. N., and W. G. Wood: Amer. J. Physiol. **39**, 54 (1916). — Rein, H. (1): Erg. Physiol. **32**, 28 (1931). — Rein, H., u. O. Mertens (2): Pflügers Arch. **237**, 231 (1936). — Rein, H., u. M. Schneider (3): Pflügers Arch. **239**, 465 (1938). — Schneider, D.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **176**, 111 (1934). — Schweitzer, A., and S. Wright: J. of Physiol. **88**, 459 (1936). — Spychala, V.: Z. exper. Med. **83**, 203 (1932). — Tournade, A., et J. Malméjac: C. r. Soc. Biol. (Paris) **100**, 708 (1929).

Dr. Wolfgang Felix, Pharmakol. Institut der Universität,
München 15, Nußbaumstr. 28

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 352—359 (1956)

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen (Direktor: Prof. Dr. N. Henning)

Über den Verbleib von methyl-thioäthyl-2′-pentyl-thiobarbitursaurem Natrium* im Rattenkörper

Von

E. R. Heise und K. H. Kimbel

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. Juli 1955)

Bei der Anwendung der Thiobarbitursäurepräparate als Kurznarkotica wurde gelegentlich beobachtet, daß die Wirkung nicht der verwendeten Dosis entspricht. Man neigt in manchen Fällen dazu, stärkeres oder fehlendes Fettpolster für die abgeschwächte oder verstärkte Narkosewirkung verantwortlich zu machen; in anderen Fällen fehlt jede Erklärung. Es war daher notwendig, die Frage der Verteilung und des Abbaues im Organismus zu untersuchen. Dazu bietet sich die Möglichkeit, die ursprüngliche Substanz von den entstehenden Umwandlungsprodukten durch zwei getrennte Farbreaktionen[3] zu unterscheiden. Obwohl die Empfindlichkeit der Zwikker[4]-Reaktion durch eine Modifikation[3] erhöht wurde, gelang es nicht, die mit Chloroform aus Rattenorganen nach intravenöser Injektion einer mittleren Dosis extrahierten Substanzmengen photometrisch zu bestimmen. Die chromatographische Untersuchung der Abbauprodukte scheiterte am Fehlen eines geeigneten Lösungsmittelgemisches. Die modifizierte Zwikkersche Reaktion[4] ist zum Nachweis auf dem Papierchromatogramm geeignet, meist aber nicht empfindlich genug. Eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit ist durch Aufsprühen von Fluoreszenzfarben möglich; man erkennt die Thiobarbitursäure und ihre Derivate an der Fluoreszenzauslöschung. Eine Identifizierung der im Körper entstehenden Abbauprodukte setzt aber eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit um etwa 2 Zehnerpotenzen voraus, die wahrscheinlich nur durch Markierung der Ausgangssubstanz mit radioaktivem Schwefel oder Kohlenstoff zu erreichen ist.

Es schien uns aber möglich, schon heute etwas über die Verteilung der Methylthioäthyl-2′-pentylthiobarbitsäure als Na-Salz(I) und ihrer Abbauprodukte im Tierkörper auszusagen und zu prüfen, wie weit die aus den Organen extrahierten Substanzen noch narkotisch wirksam sind. Hierzu konnten weniger spezifische, aber empfindlichere Nachweis-Methoden verwendet werden. In letzter Zeit bedient man sich mehr und mehr der Ultraviolettabsorption[1,2] zur quantitativen Analyse von

* Als Thiogenal, E. Merck, A. G., im Handel.

Pharmaka in Organen, die bei einer Wellenlänge von 306 nm* auch für Thiobarbiturate geeignet ist. Wir zogen die Extraktion der Verbindung mit Chloroform der mit Isoamylalkohol-Petroläther vor, weil ersteres Extrakt leichter einzuengen ist und der letztgenannten Methode gegenüber keine Nachteile aufweist. Das einfache, zugleich mit der Homogenisierung der Organe auszuführende Extraktionsverfahren setzt eine Berücksichtigung der Organleerwerte bei der angegebenen Wellenlänge voraus. Nach den Angaben der Literatur[1] sind letztere von Tier zu Tier schwankend, so daß man sich nicht auf gleich behandelte Kontrollen beziehen kann. Auch die von Brodie[1] empfohlene indirekte Bestimmung der Leerabsorption aus der Extinktion einer anderen Wellenlänge ist nach unseren Ergebnissen nicht zulässig. Wir bestimmten daher zunächst aus Meßwerten von 9 Organen an 13 Ratten Mittelwerte und mittlere quadratische Streuung, um durch Berücksichtigung der Streuung der Leerextinktion die Fehlergrenze der Analyse festzulegen.

Methodik

Zur Bestimmung der Streuung der Leerextinktion wurden 13 180—230 g schwere Albinoratten, die 48 Std nüchtern waren, durch Genickschlag getötet, die unten genannten Organe entnommen und durch Abtupfen auf Fließpapier von anhaftendem Blut befreit. Nach Wägung wurden sie mit 50 ml Chloroform im Starmix homogenisiert, das Homogenat auf ein weiches Faltenfilter gegeben und mit weiteren 50 ml Chloroform die Rückstände im Starmixbecher erneut ausgezogen. Nach Filtration der vereinigten Extrakte wurden diese im Vakuum bei 45 mm Hg und 40° C auf wenige ml eingeengt. Dieses Vorgehen erwies sich für die folgende Extraktion mit 5 ml n NaOH nützlich, die in 10 ml fassenden Zentrifugengläsern in einer Schüttelmaschine durchgeführt werden konnte. Die sich hierbei bildende Emulsion kann nun leicht durch scharfes Abzentrifugieren bei 1500 g getrennt werden. Der wäßrige Überstand wird mit einem kleinen Sauger möglichst vollständig abgehoben. Aus ihm wird die jeweils zur Messung benötigte Menge abpipettiert. Wir verdünnten den Natronlaugenauszug 5, 10 bzw. 15fach, um im günstigsten Extinktionsbereich messen zu können. Hierzu verwendeten wir das Spektralphotometer mit Quarzmonochromator MQ 4 von Carl Zeiß mit Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke. Zur Prüfung der Beständigkeit der Absorption bei längerem Stehen wurden die Auszüge nach 3 Tagen erneut gemessen, die Zunahme betrug etwa 10%; bei den Wellenlängen über 300 nm blieb sie gleich. Die Messungen der Verteilung von I und u.-v.-absorbierender Umwandlungsprodukte wurde an den auf gleiche Weise gewonnenen Auszügen von Leber, Niere und Fettgewebe von 24 Albinoratten gleichen Gewichtes und Ernährungszustandes vorgenommen. Die Auszüge der übrigen Organe enthielten so wenig u.-v.-absorbierende Substanz, daß die durch I bedingte Extinktion im Bereich der Leerwerte lag. Zur Prüfung der narkotischen Wirksamkeit der u.-v.-absorbierenden Substanz im Extrakt wurde der nach obigem Vorgehen gewonnene Auszug in n NaOH im Vacuum eingeengt, mit n H_2SO_2 auf p_H 2,5 gebracht, d. h. alles Natriumsalz in die Säure überführt und die Säure nochmals mit reichlich Chloroform extrahiert. Der Chloroform-Auszug wurde erneut zur Trockene eingeengt, der Rückstand in 3 ml 0,02 n NaOH aufgenommen und intraperitoneal injiziert.

* nm (Nanometer) = 10^{-6} mm = 10 Å; normgerechte Bezeichnung für 1 mμ.

Tabelle 1. *Mittlere Extinktion und 2 σ von Rattenorganen pro Organ bzw. Gewebe zwischen 250 und 350 nm*

λ nm		Leber E 1 cm/ Organ	Niere E 1 cm/ Organ	Fettgewebe E 1 cm/ Gesamt	Gehirn E 1 cm/ Organ	Herz E 1 cm/ Organ	Magen, Darm E 1 cm/ Organ	Lunge E 1 cm/ Organ	Milz E 1 cm/ Organ	Skelettmuskel E 1 cm/ 2,5 g	Leber E 1 cm/ 1 g	Niere E 1 cm/ 1 g	Fettgewebe E 1 cm/ 1 g	Magen, Darm E 1 cm/ 1 g
350	M	0,025	0,015	0,030	0,010	0,020	0,076	0,067	0,002	0,006	0,004	0,014	0,015	0,008
	2σ	0,032	0,018	0,030	0,050	0,032	0,130	0,088	0,006	0,009	0,005	0,015	0,019	0,010
340	M	0,030	0,018	0,040	0,013	0,023	0,087	0,082	0,005	0,010	0,006	0,016	0,019	0,009
	2σ	0,066	0,016	0,044	0,049	0,038	0,099	0,107	0,007	0,012	0,005	0,019	0,023	0,011
330	M	0,040	0,024	0,046	0,018	0,027	0,080	0,094	0,009	0,021	0,008	0,020	0,022	0,010
	2σ	0,097	0,020	0,046	0,052	0,042	0,130	0,107	0,009	0,020	0,008	0,017	0,030	0,011
320	M	0,065	0,041	0,075	0,030	0,048	0,140	0,117	0,023	0,056	0,012	0,032	0,037	0,015
	2σ	0,056	0,028	0,070	0,063	0,046	0,162	0,149	0,022	0,028	0,008	0,019	0,042	0,015
310	M	0,096	0,079	0,115	0,055	0,078	0,203	0,157	0,049	0,115	0,020	0,053	0,059	0,023
	2σ	0,096	0,054	0,108	0,086	0,066	0,200	0,144	0,040	0,062	0,012	0,045	0,076	0,021
306	M	0,113	0,078	0,124	0,059	0,085	0,237	0,168	0,052	0,110	0,020	0,058	0,061	0,026
	2σ	0,068	0,052	0,116	0,090	0,058	0,268	0,186	0,040	0,046	0,012	0,044	0,072	0,026
300	M	0,114	0,084	0,132	0,073	0,090	0,285	0,181	0,054	0,107	0,023	0,063	0,064	0,034
	2σ	0,091	0,052	0,120	0,094	0,050	0,318	0,162	0,046	0,049	0,014	0,039	0,063	0,029
290	M	0,143	0,102	0,150	0,061	0,101	0,407	0,205	0,056	0,095	0,030	0,077	0,071	0,046
	2σ	0,108	0,074	0,144	0,063	0,060	0,470	0,178	0,045	0,048	0,017	0,043	0,064	0,031
280	M	0,188	0,123	0,168	0,084	0,108	0,625	0,219	0,066	0,084	0,041	0,096	0,079	0,068
	2σ	0,152	0,108	0,162	0,076	0,084	0,928	0,186	0,046	0,059	0,022	0,048	0,066	0,054

Tabelle 1 (Fortsetzung)

270	*M*	0,321	0,147	0,182	0,096	0,121	0,793	0,247	0,064	0,117	0,066	0,118	0,088	0,085
	2σ	0,286	0,122	0,180	0,092	0,108	1,115	0,192	0,050	0,064	0,029	0,048	0,076	0,056
260	*M*	0,374	0,168	0,205	0,123	0,141	0,874	0,294	0,073	0,125	0,079	0,135	0,096	0,079
	2σ	0,334	0,130	0,204	0,113	0,122	1,212	0,234	0,056	0,086	0,031	0,052	0,086	0,039
250	*M*	0,376	0,207	0,247	0,146	0,173	1,017	0,404	0,089	0,139	0,079	0,165	0,112	0,093
	2σ	0,280	0,147	0,248	0,127	0,162	1,280	0,326	0,083	0,102	0,034	0,065	0,102	0,048

Ergebnisse

Die mittleren Leerextinktionen pro Gesamtorgan von 13 Tieren und pro g Gewebe von 9 Tieren sind nebst der Normalstreuung von 2 σ in Tab. 1 dargestellt. Man sieht, daß der 2 σ-Wert bei allen Organen mit abnehmender Wellenlänge ebenfalls abnimmt. Unterschiede in der Streuung zeigen sich bei den einzelnen Organen vornehmlich im Bereiche über 300 nm, wobei die Streuung der Organe mit kleinem Gewicht und bei Bezug der Extinktion auf das Gesamtorgan kleiner Extinktion erheblich zunimmt und ein mehrfaches des Mittelwertes betragen kann. Für Leber, Niere, Fettgewebe und Magendarmkanal ergab die Berechnung der Extinktion pro g Gewebe eine erhebliche Einengung der Streubreite, während sie bei den übrigen Organen wegen fehlender Korrelation zwischen Extinktion und Organgewicht keinen Vorteil brachte und deswegen nicht angegeben ist. Da die praktische Anwendung unserer Ergebnisse voraussetzt, daß die Extinktion der gesuchten Substanz pro g Gewebe um mindestens eine Größenordnung höher sein muß als der Mittelwert, ist in Tab. 2 unter Annahme einer 10fach höheren Extinktion der im Gewebeextrakt gegenüber dem Leerwert gesuchten Substanz die untere Erfassungsgrenze für 4 verschiedene Thiobarbituratpräparate angegeben. Zugrundegelegt ist die Extinktion der genannten Substanzmenge bzw. 1 g Gewebe nach Extraktion in 5 ml n NaOH. Unter diesen willkürlichen Bedingungen ist es möglich, je nach Organ Thiobarbituratmengen zwischen 10,3 und 35,4 γ/g Gewebe mit höchstens $\pm$ 10% Streuung zu bestimmen. Als Wellenlänge wurde die maximale Absorption der genannten Präparate bei 306 nm gewählt. Die Absorptionskurven der reinen und aus Fettgewebe extrahierten Verbindung wie der Leerextinktion von Leber und Fettgewebe gehen aus Abb. 1 hervor.

Aus Tab. 2 geht hervor, daß man unter Annahme einer Toleranz des Leerwertes von 10%

der geringsten, meßbaren Konzentration bei $\pm 2\,\sigma$ Streuung für das Natriumsalz der Methylthioäthyl-2′-pentyl-thiobarbitursäure (I) in der Leber noch 11,6 γ, in der Niere 33,6 γ und im Fettgewebe 15,1 γ durch die Ultraviolettabsorption bei 306 nm nachweisen kann. Es schien demnach berechtigt, mit der Methode die Verteilung intravenös verabreichter Substanz I bei der Ratte zu untersuchen. Die Analysenergebnisse sind in Abb. 2 dargestellt. Je 2 Tiere (3 Tiere sofort nach dem Erwachen) wurden 5, 10 und 20 min, sowie unmittelbar nach dem Aufwachen und weiter 1, 2, 3, 6, 12 und 18 Std nach Wiederauftreten der Stellreflexe getötet. Die injizierte Dosis betrug durchweg 12,5 mg I. Zu Beginn der Narkose scheint der größte Teil der Substanz im Blut zu zirkulieren. Der Lebergehalt steigt in den ersten 10 min an, um nach 20 min zugunsten des Fettgewebes abzufallen. Der Anstieg der extrahierten Substanz im Fettgewebe ist jedoch höher als dem Abfall des Lebergehaltes entspricht. Unmittelbar nach dem Aufwachen bewegen sich Fettgewebe- und Leberkonzentration in gleicher Höhe, die gefundene ultraviolettabsorbierende Substanz in den Nieren ist aber wesentlich angestiegen.

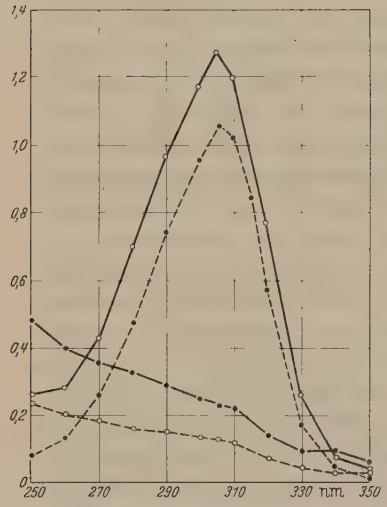


Abb. 1. Absorptionskurven von Thiogenal als Substanz •----• und nach Extraktion aus dem Fettgewebe °——°; sowie die Leerextinktionen von Leber •——• und Fettgewebe °----°

Eine Stunde nach Narkoseende beginnt die aus der Leber extrahierbare Substanz stetig abzufallen, um nach 18 Std den doppelten Wert der Leerextinktion zu erreichen, d. h. praktisch ausgeschieden zu sein. Die aus dem Fett extrahierbare Verbindung wird 1 Std nach dem Erwachen stärker konzentriert gefunden, später nimmt sie stetig ab, bleibt aber stets höher als der Gehalt der Leber. Die Ultraviolettabsorption des Gehirnextraktes bleibt dagegen während der gesamten Versuchsdauer unverändert niedrig. Die Extinktionswerte der übrigen untersuchten Organe: Herz, Lunge, Muskulatur und Magen-Darmkanal waren so niedrig, daß sie von der Leerextinktion statistisch nicht abzutrennen waren. Von größerem Interesse als der zeitliche Ablauf der Organverteilung scheint der in den Organen gefundene prozentuale Anteil an der Gesamteingabe. Zunächst wurden 3 Tiere sofort nach der Injektion von 12,5 mg I getötet und unverzüglich aufgearbeitet. Es fanden sich 39, 51 und 52% der Dosis wieder. Ob die fehlende Substanzmenge in der kurzen Zeitspanne zwischen der Injektion und Tötung oder nach der

Tötung bis zur Extraktion fermentativ abgebaut oder so verändert wird, daß sie weder mit Chloroform exthrahierbar ist, noch bei 306 nm absorbiert, können wir nicht entscheiden. Die Anteile der Organe bewegten sich beim Fettgewebe in den ersten 20 min zwischen 3,5 und 10,3%, nach dem Erwachen um 4,5%, danach fielen sie von 14,1% bis auf 0,5% ab. Der Prozentsatz der in der Leber in den ersten 20 min gefundenen Substanz lag zwischen 1,6 und 6,2%, betrug beim Erwachen 3,9% und fiel stetig bis auf 0,4% ab. In den Nieren fanden wir unter der Narkose zwischen 0,7

Tabelle 2. *Untere Erfassungsgrenze verschiedener Thiobarbiturverbindungen unter Voraussetzung, daß die Leerextinktion 10% ($\pm$ 2 σ) der gemessenen Verbindung betragen darf. Wellenlänge 306 nm = Maximalabsorption*

Organ		Thiogenal	Baytinal	Trapanal	Inactin
Leber . . .	E/g Gewebe	0,020	0.020	0,020	0,020
	E/100 γ Subst.	1,72	1,95	1,77	1,87
	Erfass.-Gr.	11,6 γ	10,3 γ	11,3 γ	10,7 γ
Niere . . .	E/g Gewebe	0,058	0,058	0,058	0,058
	E/100 γ Subst.	1,72	1,95	1,77	1,87
	Erfass.-Gr.	33,6 γ	29,8 γ	32,8 γ	31,0 γ
Fett . . .	E/1 g Gewebe	0,061	0,061	0,061	0,061
	E/100 γ Subst.	1,72	1,95	1,77	1,87
	Erfass.-Gr.	35,4 γ	31,3 γ	34,5 γ	32,6 γ
Magen/Darm	E/1 g Gewebe	0,026	0,026	0,026	0,026
	E/100 γ Subst.	1,72	1,95	1,77	1,87
	Erfass.-Gr.	15,1 γ	13,4 γ	14,7 γ	13,9 γ

und 1,7%, nach Wiederauftreten der Stellreflexe 2%, welcher Wert im Verlauf der nächsten 18 Std auf 0,1% abfiel. Gelegentlich war es möglich, den Inhalt der gefüllten Harnblase zu untersuchen, es fanden sich bei einem soeben erwachten Tier 1,6%, 1 Std nach dem Erwachen bei einem weiteren Tier 10% und einem anderen 4,8%. Es ist zwar bekannt (Brodie[1]), daß sofort nach der Injektion der größte Teil des Thiobarbiturats in die freie Säure umgewandelt wird, es schien uns aber ratsam, den noch als Natriumsalz vorliegenden Teil durch Säurezusatz in die entsprechende Säure zu überführen. Der dadurch bedingte Ausbeutegewinn war enttäuschend; er betrug etwa das dreifache der mittleren Leerextinktion. Zur Prüfung der naheliegenden Frage, ob die mit Chloroform extrahierte Substanz unverändertem Thiobarbiturat entspricht und die entsprechende narkotische Wirksamkeit aufweist, injizierten wir den Extrakt dreier mit je 12,5 mg injizierter Ratten, die unmittelbar nach der Injektion getötet wurden, 3 weißen Mäusen im Gewicht von 22 g, so daß eine Maus das 0,6, 0,9 oder 1,5fache des Einzeltierextrakts bekam. Mit der niedrigsten Dosierung wurden nur ein Excitationsstadium erreicht,

die mittlere Dosis wirkte hypnotisch bei erhaltener Schmerzreaktion, die hohe Dosis verursachte eine kurze Narkose von 3 min 20 sec. Man sieht, daß die extrahierte Substanz nur noch einen Bruchteil der ursprünglich verabreichten Narkosewirksamkeit besitzt. Das Ergebnis unserer Versuche deutet darauf hin, daß im Rattenkörper das injizierte Natriumsalz sehr rasch in die entsprechende Thiobarbitursäure übergeführt, aber bald

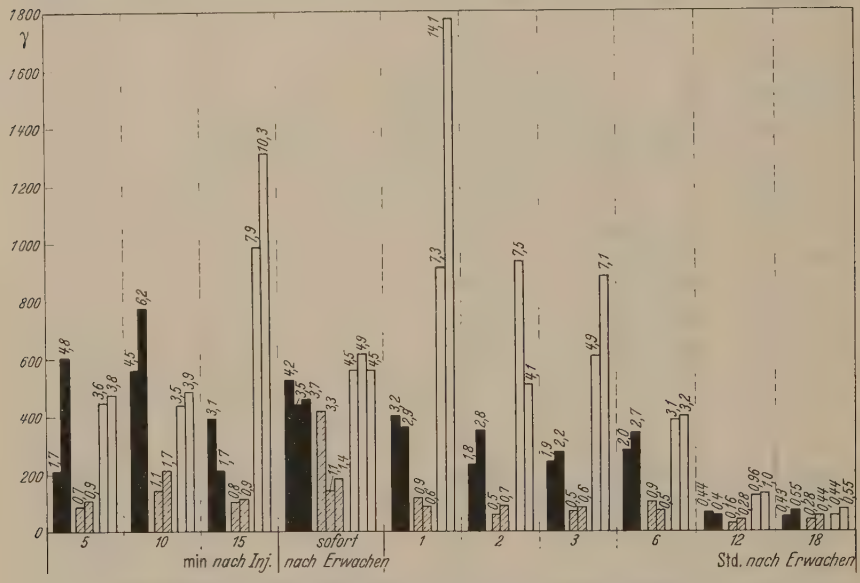


Abb. 2. Konzentrationen im Einzelorgan der nach verschiedenen Zeiten getöteten Tiere nebst Anteil an der Eingabe in Prozent. ▮ Leber; ▨ Nieren; ▯ Fettgewebe

in Verbindungen umgewandelt wird, die mit Chloroform nicht mehr auszuziehen sind. Auch der mit $HCCl_3$ extrahierbare Anteil besteht nur noch zu einem kleinen Teil aus der unveränderten Thiobarbitursäure, wie aus den Narkoseversuchen an den Mäusen hervorgeht.

Zusammenfassung

Da es noch keine empfindliche und spezifische Methode zum Nachweis der Thiobarbitursäure und ihrer Derivate bei kleinen Laboratoriumstieren gibt, wurde die Ultraviolettabsorption von Chloroformextrakten aus Organen als Maß für die Verteilung der injizierten Substanz im Tierkörper verwendet. Das injizierte Natriumsalz der Methylthioäthyl-2′-pentyl-thiobarbitursäure wird im Blut sehr rasch in die entsprechende Säure übergeführt und bald in nicht chloroformextrahierbare Verbindungen verwandelt. Der noch mit Chloroform ausziehbare, bei 306 nm maximal absorbierende Anteil besteht ebenfalls nur noch zu einem kleinen Teil aus der Ausgangssubstanz. Die bei 306 nm absorbierende

Fraktion in der Leber erreicht nach 10 min ihr Maximum und nimmt dann bis 12 Std stetig bis zum Leerwert ab. In der Niere findet sich das Maximum unmittelbar nach dem Erwachen (im Mittel 25—28 min), im Fettgewebe ist der höchste Wert nach 1 Std erreicht.

Literatur

[1] Brodie, B. B., L. C. Mark, E. M. Papper, P. A. Lief, E. Bernstein and E. A. Rovenstine: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **98**, 85 (1950). — [2] Burns, J. J., R. K. Rose, Th. Chenkin, A. Goldman, A. Schulert and B. B. Brodie: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **109**, 346 (1953). — [3] Heise, E., u. K. H. Kimbel: Arzneimittel-Forsch. **5**, 149 (1955). — [4] Zwikker, J. J. L.: Pharmaceut. Weekbl. (Amsterdam) **68**, 975 (1930).

Dr. E. R. Heise, Medizinische Universitäts-Klinik Erlangen

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 360—372 (1956)

Aus der Physiologischen Abteilung der Medizinischen Forschungsanstalt in der Max-Planck-Gesellschaft (Leiter: Prof. Dr. W. Schoedel) und dem Pharmakologischen Institut der Universität (Leiter: Prof. Dr. L. Lendle) Göttingen

Die Wirkung von Adrenalin, Nor-Adrenalin, Acetylcholin und Vagusreizung auf die Sauerstoffsättigung des Blutes im Sinus coronarius, untersucht mit fortlaufender photometrischer Methode

Von

W. Lochner, H. Mercker und E. Schürmeyer

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. August 1955)

Für die Beurteilung der Sauerstoffversorgung des Herzmuskels stellt die Sauerstoffsättigung des venösen Coronarblutes eine wichtige Größe dar. Nur wenn im venösen Blut eine genügend hohe O_2-Sättigung vorhanden ist, ist eine ausreichende O_2-Versorgung aller Teile des Herzmuskels gewährleistet. Besonders bei Änderungen des O_2-Bedarfes des Herzmuskels kann die Anpassung der Coronardurchblutung nur dann beurteilt werden, wenn die O_2-Sättigung im venösen Blut bekannt ist. Dieses kann beispielsweise bei der Prüfung von gefäßaktiven Stoffen eine Rolle spielen, wenn neben einer Wirkung auf den allgemeinen Kreislauf ein spezieller Effekt auf den Coronarkreislauf in Frage steht. Die allgemeinen Kreislaufwirkungen können die Herzarbeit und den arteriellen Blutdruck beeinflussen und dadurch eine Wirkung auf die Coronardurchblutung haben. Es ist zu fragen, wie weit im einzelnen Fall die Durchblutung auf den O_2-Bedarf des Herzmuskels abgestimmt ist. Darum genügt nicht nur der Nachweis, daß bei physiologischen Anpassungsvorgängen oder nach Verabfolgung eines Pharmakons eine Erhöhung der Coronardurchblutung zu messen ist. Es ist vielmehr erforderlich zu prüfen, ob bei Summation aller Wirkungen eine bessere oder eine schlechtere O_2-Versorgung des Herzmuskels resultiert. Auf diese Zusammenhänge wurde auch bereits von Gollwitzer-Meier u. Kroetz[12] und Wégria[28] hingewiesen.

Die entscheidende Größe ist natürlich der Sauerstoffdruck. Seine Messung ist aber verhältnismäßig zeitraubend und fortlaufend zur Zeit wohl noch nicht möglich. Für unsere Fragestellung ergibt die Betrachtung der Sauerstoffsättigung ein ausreichendes Bild.

Die in der Literatur mitgeteilten Messungen der O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes sind spärlich und durchweg nur Einzelanalysen. Das erscheint verständlich, da die fortlaufende Messung der O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes auf einige methodische Schwierigkeiten stößt. Seine starke Venosierung erfordert eine empfindliche Meßtechnik, und bei fortlaufender Messung wirken Strömungseffekte störend. Außerdem konnte bislang Coronarsinusblut nur bei eröffnetem Thorax mit Morawitz-Kanüle gewonnen werden. Die Katheterisierung des Coronarsinus nach dem Vorgehen von Goodale u. a.[13] macht es neuerdings jedoch möglich, Coronarsinusblut ohne Thoraxeröffnung, d. h. also bei möglichst wenig gestörten Kreislaufverhältnissen zu gewinnen.

In der vorliegenden Arbeit werden im wesentlichen die körpereigenen Stoffe Adrenalin und Nor-Adrenalin untersucht. Über ihre Wirkung auf die Coronardurchblutung liegt eine umfangreiche Literatur vor. Es gibt jedoch kaum Untersuchungen über ihre Wirkung auf die O_2-Sättigung des venösen Coronarblutes.

Gollwitzer-Meier u. Kroetz[12] haben Beobachtungen mitgeteilt, die sich mit unseren, wie weiter unten diskutiert, nicht ganz decken. Sie haben die Sättigung zwar fortlaufend gemessen, mußten aber mit der Morawitz-Kanüle, d. h. eröffnetem Thorax arbeiten. In neuerer Zeit haben West, Mercker u. Mitarb.[29] einige Befunde über die Wirkung des Adrenalins und Nor-Adrenalins bei Dauerinfusion mitgeteilt. Das venöse Coronarblut wurde mittels Katheter gewonnen, jedoch handelte es sich dabei um Einzelentnahmen und nicht um eine fortlaufende Messung der O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes.

Methodik

Die Versuche wurden an Hunden in Morphin-Urethan-Chloralose-Narkose durchgeführt. Zunächst wurden 2 mg/kg Morphin subcutan, und 1 Std später das Chloralose-Urethan-Gemisch intravenös verabfolgt. (250 mg Urethan + 80 mg Chloralose in 3 cm^3 H_2O pro Kilogramm Hund.) Die Sauerstoffsättigung des venösen Coronarblutes wurde fortlaufend photometrisch gemessen. Hierbei wurde das Blut durch Katheterisierung des Sinus coronarius nach dem Vorgehen von Goodale u. a.[13] gewonnen. Wir führten den Katheter von der rechten Vena jugularis externa aus in das Gefäßsystem ein. Die Katheterisierung wurde bisher an insgesamt 17 Hunden durchgeführt; einmal gelang es nicht, den Katheter in den Coronarsinus zu bekommen. Die anschließende Autopsie ergab in diesem Falle einen sehr engen Sinus mit ausgeprägter Taschenbildung.

Um das Coronarvenenblut fortlaufend auf seine Sauerstoffsättigung untersuchen zu können, wurde es mittels einer geeigneten Pumpe aus dem Katheter durch ein Photometer gezogen und durch dieselbe Pumpe in die linke Vena jugularis reinfundiert. Die Blutgerinnung mußte durch Heparin (7 mg/kg) aufgehoben werden.

Die Abb. 1 zeigt die Absaugpumpe. Sie ist so gebaut, daß sie das Blut mit gleichbleibender Geschwindigkeit durch das Photometer saugt. Die Geschwindigkeit ist auch dann konstant, wenn sich der Druck an der Katheterspitze ändert. Die konstante Absauggeschwindigkeit ist notwendig, weil die Lichtdurchlässigkeit des Blutes von der Geschwindigkeit der Blutströmung abhängig ist (Kramer[22], Opitz[24], Wever[30]). Die Pumpe hat zwei aufrecht stehende Zylinder. Die Kolbenstangen sind als Gewindespindeln ausgebildet und werden durch ein Schneckengetriebe über ein Schneckenrad in gegensinniger Richtung bewegt. Die Kolbenstange, die jeweils

unten ist, löst einen Kontakt aus, durch den Elektromagnete in Tätigkeit gesetzt werden. Diese Elektromagnete stellen die Ventile um. Gleichzeitig wird durch die Bewegung der Schubstange der Ventilsteuerung ein Polwendeschalter betätigt, der den Drehsinn des Motors ändert. Auf diese Weise wird eine volle Synchronisation der

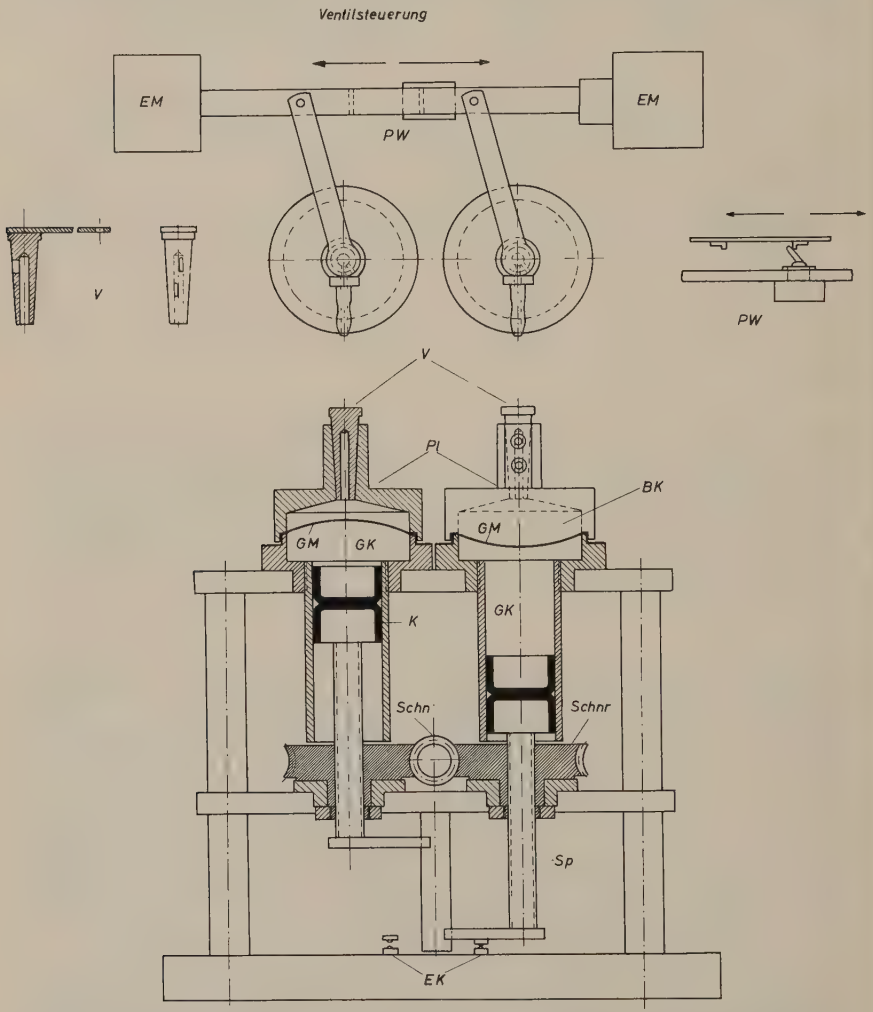


Abb. 1. Absaugpumpe, Beschreibung im Text. *EM* Elektromagnet, *V* Ventil, *Pl* Plexiglaskapsel, *BK* Blutkammer, *GK* Glycerinkammern, *K* Kolben, *Schn* Schnecke, *Schnr* Schneckenrad, *Sp* Spindel, *PW* Polwendeschalter, *EK* elektrische Kontakte, *GM* Gummimembran

Ventilsteuerung und Kolbenbewegung erreicht. Die Zylinder sind mit Glycerin gefüllt (Glycerinkammer) und von den Blutkammern durch eine Gummimembran getrennt. Die maximale Förderleistung beträgt 40 cm³/min.

Wir benutzten das von Kramer[22] angegebene Oxymeter, das aus einem Selenelement und einer Glühlampe besteht. Die Registrierung geschah mit einem

Spiegelgalvanometer. Um das Photometer überschlägig eichen zu können, sind wir folgendermaßen vorgegangen: Wir haben einen zweiten Katheter, auch von der rechten Vena jugularis aus, in den rechten Vorhof eingeführt, und konnten durch diesen Katheter Blut in das Photometer saugen, daß eine andere Sauerstoffsättigung als das Coronarvenenblut hatte. Coronarvenenblut und Vorhofblut lieferten so zwei Punkte einer approximativen Photometereichung. Da das Beersche Gesetz für die beschriebene Anordnung weitgehend gilt[21], konnte aus den zwei Punkten eine genügend genaue Eichkurve ermittelt werden. Es sei aber noch einmal betont, daß die Eichung eine überschlägige ist und daß sie uns nur über die ungefähre Größe der Effekte Auskunft geben soll, da auch Änderungen der Erythrocytenkonzentration durch die Oxymeter angezeigt werden, und sich weiter die Eichkurven für die O_2-Sättigung mit veränderter Erythrocytenkonzentration etwas ändern (Kramer[21]).

Die Blutproben wurden in der van Slyke-Apparatur auf ihren Sauerstoffgehalt analysiert. Die Hämoglobinkonzentration wurde spektrophotometrisch nach Drabkin u. Austin[5] bestimmt, so daß die Sauerstoffsättigung berechnet werden konnte. Die mitgeteilten Absolutwerte der O_2-Sättigung sind also direkte Messungen. Für jeden einzelnen Wert wurden Kapazität und O_2-Gehalt wie oben angegeben bestimmt. Die Sauerstoffsättigung des arteriellen Blutes wurde durch eine an die uneröffnete A. carotis angelegte Kramersche Sauerstoffuhr registriert, und der Blutdruck durch ein strain gauge Manometer (Typ Statham). Die Art der Messung der O_2-Sättigung des venösen Coronarblutes bedingt, daß Änderungen der Sauerstoffsättigung erst nach einer gewissen Latenzzeit angezeigt werden. Diese Latenzzeit, die von der Absauggeschwindigkeit der Pumpe abhängt, betrug 8—15 sec.

Ergebnisse

Ausgangswerte der O_2-Sättigung des venösen Coronarblutes. In 44 Einzelbestimmungen an 16 Hunden betrug die O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes 19,3 ± 1,2%. Der O_2-Gehalt betrug 4,46 ± 0,33 Vol.-%.

Tabelle 1. *Zusammenstellung von Werten über O_2-Sättigung und O_2-Gehalt des Blutes im Coronarsinus. Es ist der Mittelwert mit dem mittleren Fehler angegeben, darunter der größte und kleinste Wert*

Untersucher	O_2-Sättigung %	O_2-Gehalt Vol. %	Bemerkungen
Allela	21,8 ± 3,9	—	bei einer arteriellen Sättigung von 96 ± 1,4%, narkotisierter Hund
Gregg	26,6 17 — 54	5,2 2,6 — 9,8	narkotisierter Hund
Meesmann u. Schmier	21,8 9,1 — 33,0	—	narkotisierter Hund 17 Beobachtungen
Mercker, Lochner u. Schürmeyer	19,3 ± 1,2 9,8 — 43,3	4,5 ± 0,3 2,1 — 11,6	narkotisierter Hund, 44 Messungen an 16 Hunden
Penrod	27 18 — 41	4,7 3,7 — 6,0	6 Beobachtungen an narkotisiert. Hunden, arterielle Sättigung > 90%
Bing u. Mitarb.	28,4 21,8 — 29,0	5,05 3,9 — 6,9	4 normale Versuchspersonen

Es liegen nicht allzu viele Messungen der Sättigung des venösen Coronarblutes in der Literatur vor. Die Tab. 1 gibt eine Zusammenstellung der Werte.

Allela[1] untersuchte die Abhängigkeit der venösen Sättigung des Coronarblutes von der arteriellen Sättigung. Bei einer arteriellen Sättigung von 96,6% findet er eine venöse von 21,8%. Dieser Wert liegt nicht weit von unserem Wert, der 19,3% beträgt, entfernt, so daß wir schließen können, daß die arterielle Sättigung in unseren Versuchen über 90% lag.

Adrenalin und Nor-Adrenalin. Die Abb. 2 zeigt die Wirkung einer intravenösen Adrenalininjektion auf den arteriellen Blutdruck, die Puls-

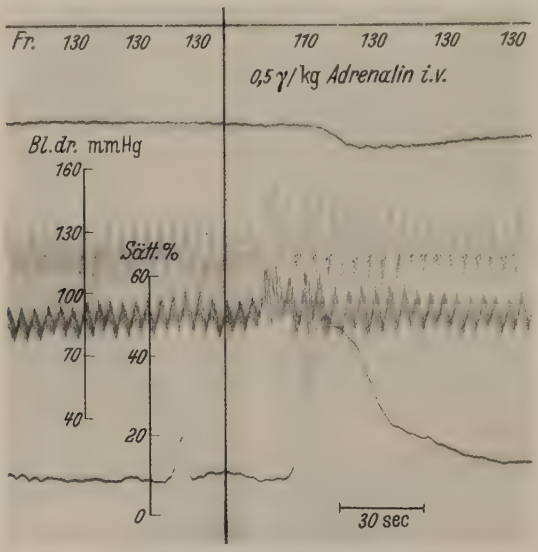


Abb. 2. Die registrierten Kurven bedeuten von unten nach oben: O_2-Sättigung im Sinus coronarius, arterieller Blutdruck, O_2-Sättigung in der A. carotis communis, Zeitschreibung alle 30 sec unterbrochen. Der Ausschlag der Sinussättigung vor der Adrenalininjektion ist ein Artefakt, hervorgerufen durch die Umschaltung der Pumpe

frequenz, die arterielle O_2-Sättigung sowie die O_2-Sättigung des Coronarvenenblutes. Die Adrenalinmenge ist so bemessen, daß es zu einem deutlichen Anstieg des arteriellen Blutdrucks kommt, sowie über die depressorischen Kreislaufreflexe zu einer Pulsverlangsamung. Die Sauerstoffsättigung des venösen Coronarblutes steigt deutlich an. Demgegenüber tritt zeitlich etwas später eine verminderte Lichtdurchlässigkeit an der arteriellen Sauerstoffuhr auf, wobei nicht zu entscheiden ist, ob diese Änderung auf eine Zunahme der Hämoglobinkonzentration oder auf eine Verminderung der O_2-Sättigung zurückzuführen ist. Es ist jedoch zu schließen, daß die vermehrte Lichtdurchlässigkeit des venösen Blutes nicht durch eine gleichsinnige Änderung des arteriellen Blutes verursacht ist.

Der beschriebene Effekt konnte an insgesamt 16 verschiedenen Hunden mit jeweils mehrfachen Injektionen gezeigt werden. Die Erhöhung der O_2-Sättigung des venösen Coronarblutes nach intravenöser Adrenalininjektion tritt so gesetzmäßig auf, daß man die Reaktion als einen Test für die richtige Lage des Katheters im Coronarsinus benutzen kann. Liegt der Katheter dagegen im Vorhof, so beobachtet man nach Adrenalin und auch nach Nor-Adrenalin eine Abnahme der Lichtdurch-

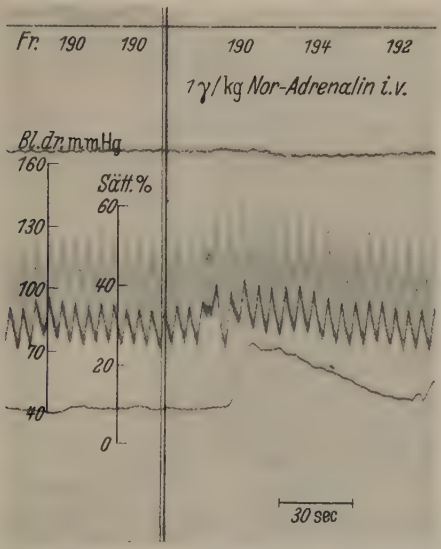


Abb. 3. Hund von 18 kg mit durchgeschnittenen Nervi vagi. Bezeichnungen siehe Abb. 2

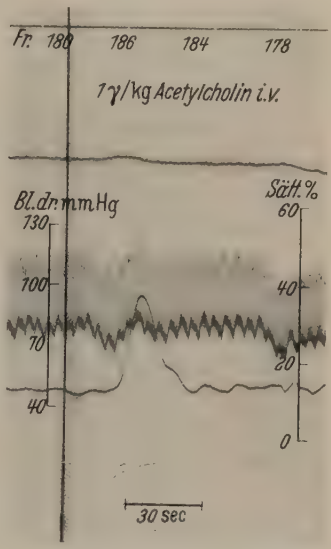


Abb. 4. Hund von 18 kg. Bezeichnungen siehe Abb. 2

lässigkeit des Blutes, die zeitlich etwas später einsetzt und etwas träger verläuft als die Änderung der Lichtdurchlässigkeit im Coronarblut.

Die Abb. 3 zeigt am selben Hund die Wirkung einer intravenösen Injektion von Nor-Adrenalin. Auch nach Nor-Adrenalin kommt es zu einem deutlichen Anstieg der venösen Sättigung des Coronarblutes bei gleichzeitigem Anstieg des arteriellen Druckes und einer Verminderung der Pulsfrequenz. Die Betrachtung der arteriellen Sauerstoffuhr zeigt auch hier, daß die Änderung der Lichtdurchlässigkeit des venösen Blutes nicht auf gleichgerichtete Änderungen der Lichtdurchlässigkeit des arteriellen Blutes zurückzuführen sind. Der Effekt wurde an insgesamt 10 verschiedenen Hunden mit jeweils mehreren Injektionen beobachtet.

Um den Adrenalin- und Nor-Adrenalin-Effekt noch weiter analysieren zu können, wurden die Hunde in der verschiedensten Weise vorbehandelt und dann die beiden Substanzen injiziert. Auf die Begründung für dieses Vorgehen wird im einzelnen in der Besprechung eingegangen.

a) Es wurden die Nervi vagi am Hals durchtrennt, um damit die Kreislaufentlastungsreflexe weitgehend auszuschalten.

(Adrenalin an 3 Hunden, Nor-Adrenalin an 2 Hunden.)

b) Zuzüglich zur Durchschneidung der Vagusnerven wurden die Sinus carotici operativ denerviert, um hierdurch diejenigen Anteile von Kreislaufreflexen auszuschalten, die von den Sinus carotici ausgelöst werden, die aber auf einem anderen Wege als dem der efferenten Vagusnerven auf das Herz wirken können.

(Adrenalin an 2 Hunden, Nor-Adrenalin an 2 Hunden.)

c) Es wurde die Frequenzwirkung des Entlastungsreflexes durch Atropinisierung (0,1—1 mg/kg) geblockt.

(Für das Adrenalin und Nor-Adrenalin an je 1 Hund.)

d) Die Hunde wurden zuzüglich zur Vagusdurchschneidung atropinisiert.

(Adrenalin und Nor-Adrenalin je 1 Hund.)

In all diesen Versuchen (a—d) bewirkten das Adrenalin und das Nor-Adrenalin nach intravenöser Injektion eine Erhöhung der Sauerstoffsättigung des venösen Coronarblutes.

e) Schließlich konnte gelegentlich die Dosierung des Adrenalins so gewählt werden, daß es zu einer Erhöhung der venösen Sättigung kam, bei fast vollständig fehlender Kreislaufwirkung (kein Anstieg des arteriellen Blutdruckes, keine Änderung der Herzfrequenz). Für das Nor-Adrenalin gelang dies nicht. Die kleinsten Dosen, die eine Erhöhung der Sättigung bewirkten, zeigten immer deutliche, wenn auch kleine Blutdruckerhöhungen. Man kann ganz allgemein sagen, daß sich das Adrenalin in seiner Wirkung auf die O_2-Sättigung als wirksamer erwies.

Acetylcholin. Intravenöse Injektion von Acetylcholin führt zu einem starken Anstieg der venösen Sauerstoffsättigung des Coronarblutes. (Es wurde mehrfach an insgesamt 6 Hunden gegeben.)

Die Abb. 4 zeigt, daß die Sauerstoffsättigung auch dann ansteigt, wenn die Dosis so gewählt ist, daß es noch nicht zu einer allgemeinen Kreislaufwirkung, d. h. zu einer meßbaren Blutdrucksenkung und Änderung der Pulsfrequenz kommt. Im Versuch der Abb. 5 kommt es nach einer großen Dosis von Acetylcholin zu einer starken Blutdrucksenkung. Trotzdem steigt die O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes an.

Vagusreizung. In einer Reihe von Versuchen wurde das periphere Ende des durchschnittenen rechten Nervus vagus am Hals elektrisch gereizt. Die Reizung erfolgte nach dem Vorgehen von Erdmann u. Mercker[7] mit niedrigen Reizfrequenzen. Man erhält auf diese Weise Änderungen der Herzfrequenz, die sich auf ein viele Minuten dauerndes konstantes Niveau einstellen lassen. Als Maß für den Reizerfolg betrachteten wir also die Änderungen der Herzfrequenz, deren Wirkung

auf die O_2-Sättigung des venösen Coronarblutes wir mit diesen Experimenten untersuchen wollten.

Die Abb. 6 gibt ein typisches Versuchsbeispiel. Sofort nach dem Einsetzen der Pulsverlangsamung kommt es zu einem deutlichen Anstieg der venösen Sauerstoffsättigung. Es muß hier berücksichtigt werden, daß die Kurve der venösen Sättigung gegenüber der Blutdruckregistrierung aus meßtechnischen Gründen um 15 sec nach rechts versetzt ist. Diesen Anstieg der venösen Sättigung mit Pulsverlangsamung durch Vagus-

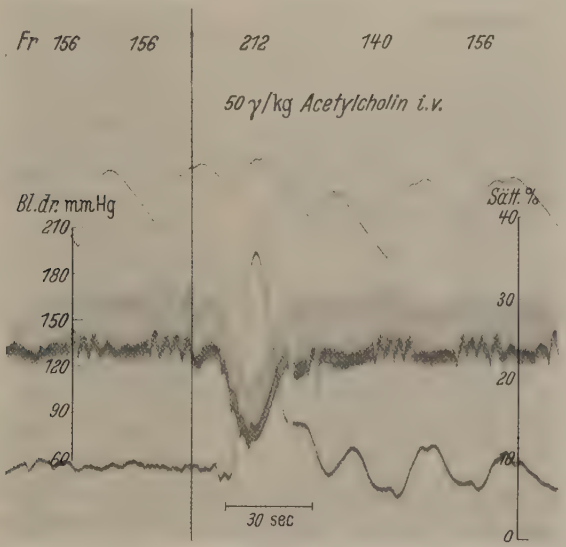


Abb. 5. Hund von 23,5 kg. Bezeichnungen siehe Abb. 2. Die Schwankungen der arteriellen Sättigung erklären sich durch periodische Schwankungen der Atemfrequenz

reizung konnten wir an zahlreichen Versuchen bei insgesamt 5 Hunden beobachten.

Zwei Hunde wurden atropinisiert, nachdem zunächst durch das übliche Vorgehen mit Vagusreizung eine Erhöhung der Sauerstoffsättigung erzielt worden war. Bei diesen 2 Hunden war es nicht möglich, auch durch starke Modifizierung der Reizbedingungen, eine Steigerung der venösen Sauerstoffsättigung zu erzielen, wenn nicht eine Frequenzänderung erzielt wurde.

Abklemmung der Arteriae carotides. An insgesamt 3 Hunden wurden mehrfach die Arteriae carotides am Hals abgeklemmt, um hierdurch Steigerungen des arteriellen Blutdruckes hervorzurufen und die Wirkung dieser Blutdrucksteigerungen auf die venöse O_2-Sättigung des Coronarblutes zu untersuchen. Die Abb. 7 gibt ein Versuchsbeispiel. Es kommt hier nach Abklemmung zu einer Blutdrucksteigerung von 25—30 mm Hg. Die venöse O_2-Sättigung des Coronarblutes ist praktisch unverändert.

Besprechung der Ergebnisse

Adrenalin und Nor-Adrenalin. Nach den in der Literatur vorliegenden Untersuchungen kann nicht daran gezweifelt werden, daß die Coronardurchblutung nach Adrenalin und Nor-Adrenalin ansteigt[3, 4, 6, 9, 11, 12, 26]. Wie allerdings dieser Anstieg erklärt werden muß, d. h. in welchem Ausmaß die verschiedenen in Frage kommenden Faktoren beteiligt sind, ist im einzelnen noch Gegenstand der Diskussion (siehe neuerdings auch Wiggers[31]).

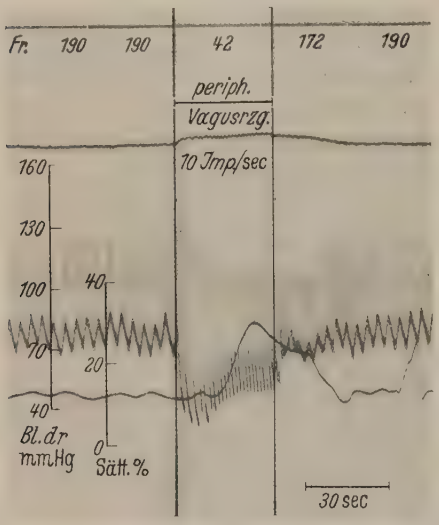


Abb. 6. Hund von 18 kg. Zwischen den beiden Lichtsignalen elektrische Reizung des peripheren Astes des durchgeschnittenen rechten Nervus vagus

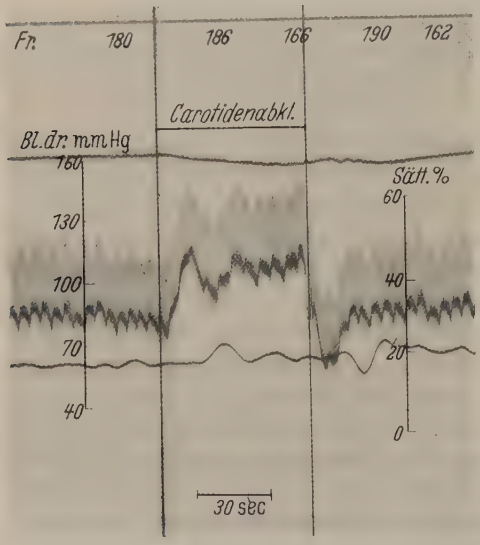


Abb. 7. Hund von 18 kg. Nervi vagi durchschnitten, zwischen den Lichtsignalen Abklemmung der beiden A. carotides am Hals

Unsere verschiedenen Experimente, in denen Adrenalininjektionen zu einer Erhöhung der venösen Sättigung führten, erlauben unseres Erachtens folgende Schlußfolgerungen:

a) Das Adrenalin erhöht auch dann die venöse Sättigung, wenn die Kreislaufentlastungsreflexe ausgeschaltet sind.

b) Der Adrenalineffekt tritt auch auf, wenn es nicht zu einer Steigerung des arteriellen Druckes kommt. Mit anderen Worten, der Effekt kann nicht allein erklärt werden durch eine vermehrte Coronardurchblutung, die durch eine Drucksteigerung bedingt ist.

Der Anstieg der venösen Sauerstoffsättigung kann ganz allgemein zustandekommen durch eine Vermehrung der Coronardurchblutung oder durch eine

Verminderung des Sauerstoffverbrauches des Herzmuskels oder durch eine Kombination beider Faktoren. (Der Sauerstoffgehalt des arteriellen Blutes darf in unseren Versuchen als weitgehend konstant bleibend angesehen werden.) Wir haben allen Anlaß anzunehmen, daß neben möglicherweise anderen Faktoren auch eine erhöhte Coronardurchblutung für den beschriebenen Effekt verantwortlich ist.

In diesem Zusammenhang ist besonders der in Abb. 8 wiedergegebene Versuch interessant. Hier kommt es zu einer außerordentlich starken Blutdrucksteigerung bei fehlendem Entlastungsreflex. Wir müssen hier mit einer starken Zunahme der Herzarbeit rechnen, trotzdem steigt die venöse Sättigung an. Das ist wohl nur durch eine Vermehrung der Coronardurchblutung über das durch die vermehrte Herzarbeit erforderliche Maß hinaus zu erklären.

Für das Nor-Adrenalin läßt sich die obige Schlußfolgerung nicht ganz so streng fassen. Es kommt auch nach Nor-Adrenalin ohne Entlastungsreflexe zu einer Erhöhung der venösen Sättigung, jedoch ist auch bei kleinsten Dosen, die zur Erhöhung einer venösen Sättigung führen, eine kleine Blutdrucksteigerung vorhanden.

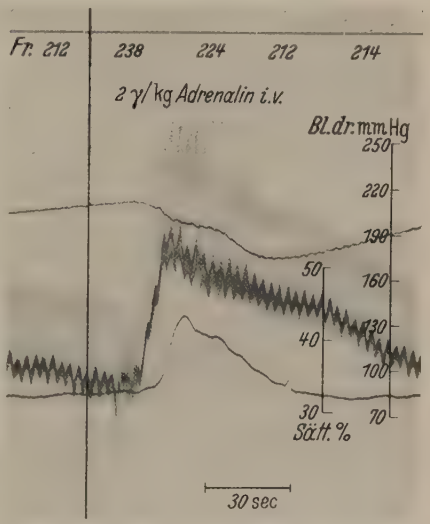


Abb. 8. Hund von 27 kg. Beide Sinus carotici operativ denerviert, beide Vagusnerven durchschnitten

Diese Befunde stehen teilweise im Gegensatz zu Untersuchungen von Gollwitzer-Meier u. Kroetz[12] und Gollwitzer-Meier u. Witzleb[11]. Diese Autoren haben die Wirkung des Adrenalins auf die O_2-Sättigung des Coronarblutes am HLP, am innervierten HLP und am innervierten Herzen in situ gemessen. Sie finden nur bei ausgeprägtem Kreislaufentlastungsreflex, d. h. bei Frequenzminderung, einen Anstieg der Sättigung. Wir finden am Herzen in situ auch ohne Entlastungsreflexe (operative Ausschaltung) einen Anstieg der Sättigung. Dieser Fall ist von den genannten Autoren nicht untersucht worden. Zwischen dem denervierten Herzen des HLP und dem Herzen in situ mit ausgeschalteten Entlastungsreflexen bestehen offenbar in bezug auf die Adrenalinwirkung Unterschiede. Warum die genannten Autoren am Herzen in situ nur einen Anstieg der Sättigung bei gleichzeitig ausgeprägter Frequenzverlangsamung gesehen haben, vermögen wir nicht zu erklären. Wahrscheinlich sind methodische Unterschiede dafür verantwortlich zu machen. Gollwitzer-Meier u. Kroetz mußten den Thorax öffnen und eine Morawitz-Kanüle in den Coronarsinus einbinden, wodurch fast immer starke Blutdrucksenkungen hervorgerufen werden.

Für das Nor-Adrenalin sind Gollwitzer-Meier u. Witzleb in einer neueren Arbeit im wesentlichen zu denselben Ergebnissen gekommen, wie Gollwitzer-Meier u. Kroetz für das Adrenalin. Die Untersuchungen wurden mit gleicher Methodik, d. h. Morawitz-Kanüle ausgeführt. Eine eingehende Diskussion erübrigt sich, da wir auf das über das Adrenalin Gesagte verweisen können. Sie fanden allerdings nach Nor-Adrenalin am HLP nicht die starken Senkungen der venösen Sättigung, wie sie sie nach Adrenalin am HLP beschrieben haben, und wie sie auch von Evans[8] und Gremels[17] beschrieben worden sind. West, Mercker u. Mitarb.[29] fanden nach Dauerinfusionen von Adrenalin und Nor-Adrenalin am intakten Hund eine Erhöhung der O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes.

Vagusreizung. Elektrische Vagusreizung führt zu einem deutlichen Anstieg der O_2-Sättigung des venösen Coronarblutes, und zwar immer dann, wenn es durch die Reizung zu einer Verlangsamung der Herzfrequenz kommt. Dieser Effekt wird besonders interessant im Zusammenhang mit der Analyse der Adrenalin- bzw. Nor-Adrenalin-Wirkung. Wenn man diese Vagusreizung nämlich, als deren entscheidenden Effekt man die Frequenzverlangsamung ansehen muß, gleichsetzt mit jener durch den natürlichen Entlastungsreflex ausgelösten Frequenzverlangsamung, so darf man sagen, daß die bei einer Adrenalininjektion auftretende Frequenzverlangsamung eine zusätzliche Ursache für den hier diskutierten Adrenalineffekt darstellen kann.

Gollwitzer-Meier u. Kroetz lösten am innervierten HLP den Kreislaufentlastungsreflex, d. h. eine Herzfrequenzverlangsamung durch eine Adrenalininjektion in den Kopfkreislauf aus. Die Sauerstoffsättigung des Coronarsinusblutes stieg hierbei in Übereinstimmung mit unseren Reizversuchen an.

Man muß sich fragen, ob bei elektrischer Vagusreizung die Verlangsamung der Frequenz der einzige durch die Reizung hervorgerufene Effekt ist. Es könnten z. B. auch sympathische Fasern mitgereizt worden sein (Greene[14]). Am atropinisierten Tier bleibt in unseren Versuchen die Frequenzverlangsamung durch Vagusreizung aus, aber auch die Erhöhung der Sauerstoffsättigung des Coronarsinusblutes.

Abklemmung der Arteriae carotides. Die Versuche mit Abklemmung der Arteriae carotides sind geeignet, einen Beitrag zu der Frage zu geben, wie der arterielle Blutdruck die venöse Sättigung des Coronarblutes beeinflussen kann. Aus rein physikalischen Gründen sollte mit einem erhöhten arteriellen Druck eine erhöhte Coronardurchblutung einhergehen. Es kann aber nicht im Voraus gesagt werden, wie sich die venöse Sättigung verhält, da mit steigendem arteriellen Druck auch der O_2-Verbrauch des Herzens ansteigt.

Da in einer Reihe von Versuchen bei recht beachtlichen Blutdrucksteigerungen die venöse Sättigung unverändert blieb, muß man schließen, daß hier Erhöhung der Herzarbeit und Erhöhung der Coronardurchblutung so parallel gingen, daß es zu keiner wesentlichen Änderung der venösen Sättigung gekommen ist. Diese Versuche sind geeignet, die oben geäußerte Ansicht zu unterstreichen, daß für den Adrenalineffekt die

Erhöhung des Blutdruckes nicht allein ursächlich verantwortlich gemacht werden kann. Voraussetzung für diese Deutung unserer Versuche ist allerdings, daß es sich um eine Blutdruckerhöhung handelt, die ohne eine starke Ausschüttung von Adrenalin und Nor-Adrenalin in das zirkulierende Blut und damit auch in die Arteriae coronariae zustande kommt. Hiermit ist aber zu rechnen, denn nach Holtz[18] wird die Blutdrucksteigerung bei Carotissinusabklemmung durch Entfernung der Nebennieren kaum beeinflußt.

Zur Kritik der Methode

Für die Beurteilung unserer Befunde ist der Ursprung des Coronarsinusblutes von Bedeutung. In erster Linie handelt es sich um venöses Capillarblut aus der Muskulatur der linken Herzkammer[27].

Man hat teilweise eine Beimischung von Blut aus den Herzkammern über die Thebesischen Gefäßes angenommen[19, 20]. Nach neueren Untersuchungen von Wiggers[10] und Gregg[15] ist es außerordentlich unwahrscheinlich, daß wesentliche Mengen von Blut über die Thebesischen Gefäße in den Sinus coronarius gelangen können, es sei denn unter sehr unphysiologischen Bedingungen, die in unseren Versuchen nicht in Frage kommen. Auch dafür, daß größere Mengen von Blut durch arteriovenöse Anastomosen fließen, besteht kein Anhalt, so daß wir es praktisch mit venösem Capillarblut zu tun haben.

Die Frage, wieviel Prozent des Coronarsinusblutes aus der Muskulatur des rechten Ventrikels stammen, ist für unsere Fragestellung von untergeordneter Bedeutung. Einmal ist die Beimischung sehr klein[15, 16] und scheint ziemlich sicher unter 10% zu liegen. Zum anderen wäre sie nur dann von Bedeutung, wenn das venöse Capillarblut aus dem rechten Ventrikel eine andere Zusammensetzung hätte als das Capillarblut aus der Muskulatur des linken Ventrikels. Es darf angenommen werden, daß die Substanzen auf die Gefäßgebiete der beiden Ventrikel gleichmäßig wirken. Auch Drucksteigerungen in der Aorta wirken sich auf alle Coronararterien gleich aus. Es bleibt noch die Möglichkeit einer unterschiedlichen Veränderung der Arbeit des linken und rechten Ventrikels, doch dürften auch diese Veränderungen für beide Ventrikel gleichsinnig verlaufen. Adrenalin und Nor-Adrenalin bewirken auch Drucksteigerungen in der A. pulmonalis. Man kommt zu dem Schluß, daß die eventuelle und geringe Beimischung aus der Muskulatur des rechten Ventrikels zum Sinusblut für unsere Ergebnisse und ihre Deutung ohne Einfluß ist.

Weiter bedeutet nicht unbedingt jede Erhöhung der venösen Sättigung eine Verbesserung der Sauerstoffversorgung der Muskelzellen.

Eine Substanz könnte den oxydativen Stoffwechsel des Herzmuskels hemmen. Man würde auch dann eine Erhöhung der O_2-Sättigung des venösen Coronarblutes bekommen, und hätte zur gleichen Zeit einen unter Umständen sehr stark schädigenden Effekt auf das Herz. Für das Adrenalin, Nor-Adrenalin und Acetylcholin spielt diese Möglichkeit wohl keine Rolle, so daß wir in unseren Experimenten von einer tatsächlichen Verbesserung des O_2-Angebotes an den Herzmuskel sprechen können.

Summary

A method is described for the continuous photoelectrical determination of the oxygen saturation of the coronary sinus blood in the intact dog.

The oxygen saturation increased after intravenous injection of epinephrine and nor-epinephrine. The effect was also observed after elimination of the depressor reflexes.

After intravenous injection of actylcholine as well as after electrical stimulation of the vagi, the oxygen saturation rose.

An increase of the arterial blood pressure by clamping of the carotid arteries had no essential influence on the oxygen saturation of the coronary sinus blood.

Wir danken Herrn G. Gebhardt und Herrn W. Nüsse für die Konstruktion der Pumpe.

Literatur

[1] Alella, A.: Pflügers Arch. **259**, 436 (1954). — [2] Bing, R. J., M. M. Hammond, J. C. Handelsman, S. R. Powers, F. C. Spencer, J. E. Eckenhoff, W. T. Goodale, J. H. Hafkenschiel and S. S. Kety: Amer. Heart J. **38**, 1 (1949). — [3] Burn, J. H., and D. E. Hutcheon: Brit. J. Pharmacol. **4**, 373 (1949). — [4] Dörner, J.: Pflügers Arch. **257**, 480 (1953). — [5] Drabkin, D. L., and J. H. Austin: J. of Biol. Chem. **98**, 719 (1932). — [6] Eckenhoff, J. E.: Anesthesiology **11**, 168 (1950). — [7] Erdmann, W. D., u. H. Mercker: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 563 (1952). — [8] Evans, L. C.: J. of Physiol. **47**, 446 (1914). — [9] Folkow, B., J. Frost u. B. Uvnäs: Acta physiol. scand. (Stockh.) **17**, 201 (1948). — [10] Geller, H. M., M. Brandfonbrener and C. J. Wiggers: Circulation Res. (New York) **1**, 152 (1953). — [11] Gollwitzer-Meier, Kl., u. E. Witzleb: Pflügers Arch. **255**, 469 (1952). — [12] Gollwitzer-Meier, Kl., u. Ch. Kroetz: Pflügers Arch. **241**, 248 (1939). — [13] Goodale, W. T., M. Lubin, J. E. Eckenhoff, J. H. Hafkenschiel, S. H. Durlacher, B. H. Landing and W. G. Banfield: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **66**, 571 (1947). — [14] Greene, C. W.: Amer. J. Physiol. **113**, 361 (1935). — [15] Gregg, D. E., and R. E. Shipley: Amer. J. Physiol. **151**, 13 (1947). — [16] Gregg, D. E.: Coronary Circulation in Health and Disease. Philadelphia 1950, S. 152. — [17] Gremels, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **182**, 1 (1936). — [18] Holtz, P., A. Engelhardt, K. Greef u. H.-J. Schümann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 58 (1952). — [19] Johnson, J. R., and C. J. Wiggers: Amer. J. Physiol. **118**, 38 (1937). — [20] Katz, L. N., K. Joachim and A. Bohning: Amer. J. Physiol. **122**, 236 (1938). — [21] Kramer, K., J. E. Elam, G. A. Saxton and W. N. Elam jr.: Amer. J. Physiol. **165**, 229 (1951). — [22] Kramer, K.: Abderhaldens Hdb. d. Biol. Arb.-Meth. Abt. V, Teil 8, S. 1085. — [23] Meesmann, W., u. J. Schmier: Z. Kreislaufforsch. **44**, 304 (1955). — [24] Opitz, E.: Pflügers Arch. **250**, 56 (1948). — [25] Penrod, K. E.: Amer. J. Physiol. **164**, 79 (1951). — [26] Rein, H.: Verh. Dtsch. Ges. Kreislaufforsch. **10**, 27 (1937). — [27] Truex, R. C., and A. W. Angulo: Anatomical Record **113**, 467 (1952). — [28] Végria, R.: Pharmacol. Rev. **3**, 197 (1951). — [29] West, J. W., H. Mercker, H. E. Lessner and E. Mezger: Federat. Proc. **13**, 163 (1954). — [30] Wever, R.: Pflügers Arch. **259**, 97 (1954). — [31] Wiggers, C. J.: Circulation Res. (New York) **2**, 271 (1954).

Dr. W. Lochner, Göttingen, Bunsenstr. 10, Med. Forschungsanstalt, Physiol. Abt.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 373—382 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität (Leiter: Prof. Dr. L. Lendle) und der Physiologischen Abteilung der Medizinischen Forschungsanstalt (Leiter: Prof. Dr. W. Schoedel) in der Max-Planck-Gesellschaft, Göttingen.

Die Wirkung vasoaktiver Pharmaka auf die Sauerstoffsättigung des Coronarsinusblutes*

Von

W. Lochner, H. Mercker und E. Schürmeyer

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. August 1955)

Bei der Beurteilung kreislaufaktiver Substanzen ergibt sich die Frage, ob unter ihrem Einfluß die Coronardurchblutung auch über den Bedarf des Herzmuskels hinaus gesteigert wird.

Das Ausmaß der Coronardurchblutung wird durch den arteriellen Blutdruck und den Strömungswiderstand im Coronargebiet bestimmt. Jede dieser Größen wird aber von zahlreichen Faktoren beeinflußt. Es kann beispielsweise eine Substanz eine starke Coronardilatation bewirken. Wenn sie aber gleichzeitig im allgemeinen Kreislauf gefäßerweiternd wirkt und damit den Blutdruck senkt, so kann hierdurch die Coronardurchblutung druckpassiv vermindert werden. Es kann in einem solchen Fall außerdem das Herzzeitvolumen aus Gründen der Kreislaufregulation erhöht sein, so daß ein vermehrter Blutbedarf des Herzmuskels besteht. Wird dadurch die Tendenz zur Blutdrucksenkung kompensiert, so kann ein normaler Blutdruck resultieren. Die Coronardurchblutung wird aber dann — dem größeren Bedarf des Herzens entsprechend — erhöht sein.

Bei guter coronardilatierender Wirkung eines Pharmakons wird man (zumindest am Herzen ohne pathologische Veränderungen) erwarten dürfen, daß die Durchblutung nach Gabe des Pharmakons über den Bedarf des Herzmuskels hinaus gesteigert wird. Wenn dieses der Fall ist, wird aber die O_2-Ausnutzung im Coronarkreislauf vermindert werden und eine höhere O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes auftreten.

Die Versuchsanordnung war die gleiche, wie sie in der voraufgegangenen Mitteilung angegeben wurde. Die Injektionen der Pharmaka erfolgten in die linke V. femoralis. Die Konzentrationen wurden jeweils so gewählt, daß die Injektionsmengen einschließlich 2 cm³ Ringerscher Lösung zum Durchspülen der Kanüle bei

* Durchgeführt mit Mitteln einer Spende, die das Pharmakologische Institut der Universität der Research Corporation, New York, verdankt.

3—6 cm³ lagen, so daß keine wesentlichen Blutverdünnungen, welche die Messung der O_2-Sättigung hätten beeinflussen können, auftraten.

Untersucht wurden folgende Pharmaka: Papaverin, Euphyllin, Coffein, Strophanthin, Nicotin, Tonephin und Effortil[1].

Befunde

Papaverin wurde in 6 Versuchen 12mal gegeben. Die Dosierung war 1—2 mg/kg. Dabei wurde regelmäßig ein erheblicher Anstieg der O_2-Sättigung im Coronarsinusblut beobachtet. Die Blutdrucksenkung war

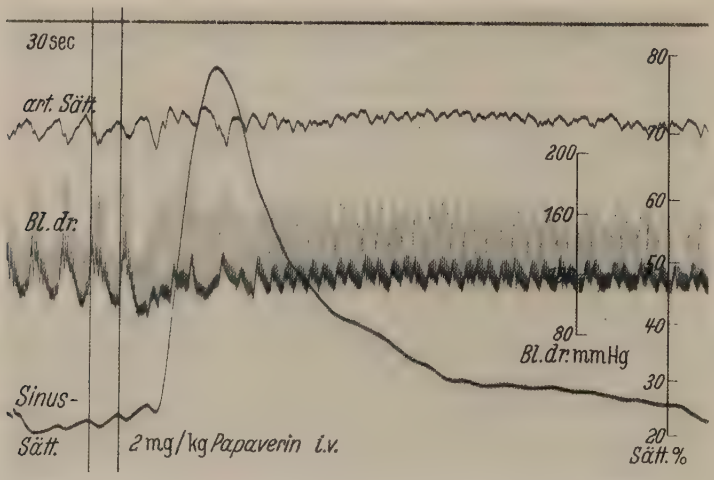


Abb. 1. Wirkung von Papaverin auf die O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes. Versuch v. 6. 5. 1955. Hund von 22,0 kg. Die registrierten Kurven bedeuten von oben nach unten: Zeitmarkierung: Unterbrechungen im Abstand von 30 sec. Arterielle O_2-Sättigung bei Spontanatmung ohne Eichung. Blutdruck, gemessen in der A. fem.; Eichung rechts auf der Abb. O_2-Sättigung im Coronarsinusblut; Eichung rechts auf der Abb. — Zwischen den Signalen Injektion von Papaverin 2 mg/kg i. v. Starker Anstieg der Sinussättigung ohne wesentliche Blutdruckwirkung. — Für zeitliche Zuordnung ist die registrierte Kurve der Sinussättigung wegen der Latenzzeit in der Messung um etwa 10 sec nach links zu versetzen

bei dieser Dosierung im allgemeinen gering. Die Abb. 1 gibt ein Beispiel für das Verhalten von Blutdruck, O_2-Sättigung im Coronarsinusblut und (näherungsweise) der O_2-Sättigung im arteriellen Blut nach Gabe von 2 mg/kg Papaverin i. v. Die Erhöhung der O_2-Sättigung über den Ausgangswert hinaus hält 2—3 min an. Die Pulsfrequenz war in diesem

[1] Benutzt wurden: Papaverinum hydrochl. „Merck", Euphyllin „Byk-Gulden", Coffein. natr. benz. u. Coffein. natr. salicyl. nach DAB 6, Nicotin „Merck", Tonephin „Hoechst" und Effortil „Boehringer Ingelheim". „Euphyllin" enthält Theophyllin und Äthylendiamin; „Tonephin" = Extrakt aus Hypophysenhinterlappen; „Effortil" = 1-(3-oxyphenyl)-1-oxy-2-aethylamino-aethan. — Wir danken den genannten Firmen für die freundliche Überlassung von Versuchsmengen.

Versuch von 132/min vor der Injektion auf 164/min kurz nach der Injektion erhöht. Sie betrug nach 1 min wieder 132/min und nach 2 min 116/min.

Euphyllin wurde in 9 Versuchen 16mal gegeben. Die Dosierung war 1—10 mg/kg. Bei niederer Dosierung führte das Euphyllin im allgemeinen zu einem geringfügigen, kurzdauernden Anstieg der O_2-Sättigung im Coronarsinusblut. Bei höherer Dosierung war dieser Anstieg stärker, wurde jedoch häufig von einer Erniedrigung unter den Ausgangswert

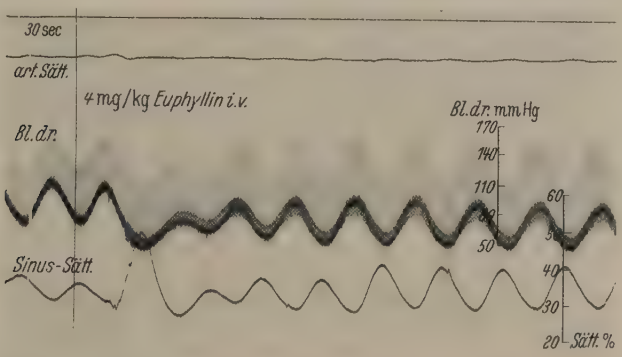


Abb. 2. Wirkung von Euphyllin auf die O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes. Versuch vom 15. 6. 1955. Hund von 29,0 kg. Bezeichnung wie bei Abb. 1. Eichungen rechts auf der Abb. Pumpenbeatmung mit O_2. — Beim Signal links auf der Abb. Injektion von 4 mg/kg Euphyllin i. v. Geringer, kurzdauernder Anstieg der Sinussättigung. Die Schwankungen in der Sinussättigung verlaufen synchron mit Schwankungen im Blutdruck und beruhen nicht auf einem Fehler in der Registrierung. — Für zeitliche Zuordnung ist die registrierte Kurve der Sinussättigung wegen der Latenzzeit in der Messung um 8 sec nach links zu versetzen

gefolgt. Bei höherer Dosis wurden auch im allgemeinen stärkere Blutdrucksenkungen beobachtet. Abb. 2 zeigt die Wirkung einer mittleren Euphyllindosis.

Coffein wurde in 6 Versuchen 8mal gegeben, im allgemeinen als Coffein. natr. benz., einmal als Coffein natr. salicyl. Dosierung: Coffein. natr. benz.: 1—3 mg/kg (in einem Versuch 5 und 10 mg/kg); Coffein. natr. salicyl.: 12 mg/kg.

Ein wesentlicher Effekt auf die O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes und auf den Blutdruck war bei einer Dosierung bis zu 5 mg/kg in keinem Versuch festzustellen (Abb. 3). Lediglich in einem Versuch mit höherer Dosis (10 mg/kg) trat eine mäßige Zunahme der O_2-Sättigung für etwa 2—3 min ein.

Strophanthin (k-Strophanthin) wurde in 5 Versuchen 5mal gegeben. Dosis: 10 γ/kg. Ein Einfluß auf die O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes und den Blutdruck war bei einer Beobachtungszeit bis zu 10 min nicht festzustellen.

Nicotin wurde in 5 Versuchen 7 mal gegeben. Dosierung: 10 bis 50 γ/kg. Es trat regelmäßig ein starker Anstieg der O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes ein. Dabei war der Blutdruck entsprechend der jeweiligen Dosis erhöht. Auch trat auf der Höhe der Blutdrucksteigerung eine Verlangsamung der Herzfrequenz ein. Die Abb. 4 gibt ein Beispiel für eine typische Nicotinwirkung.

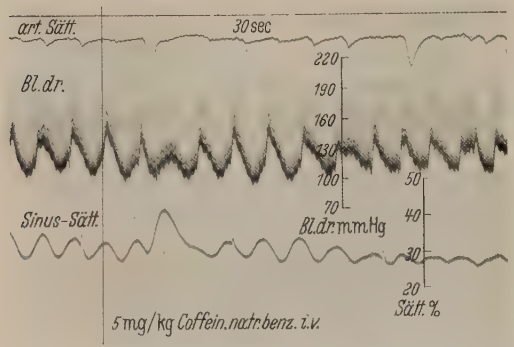


Abb. 3. Wirkung von Coffein. natr. benz. auf die O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes. Versuch vom 15. 6. 1955. Hund von 29,0 kg. Bezeichnungen wie bei Abb. 1. Eichungen rechts auf der Abb. Pumpenbeatmung mit O_2. — Beim Signal Injektion von 5 mg/kg Coffein. natr. benz. i. v. Geringfügiger Anstieg der Sinussättigung ohne Blutdruckwirkung. — Für die zeitliche Zuordnung ist die registrierte Kurve der Sinussättigung wegen der Latenzzeit in der Messung um 8 sec nach links zu versetzen

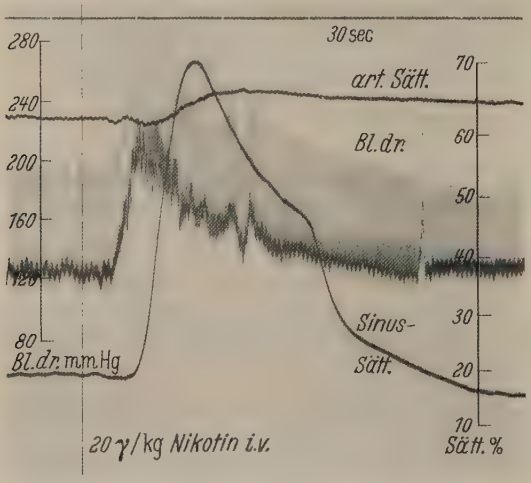


Abb. 4. Wirkung von Nicotin auf die O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes. Versuch vom 6. 5. 1955. Hund von 22,0 kg. Bezeichnungen wie bei Abb. 1. Spontanatmung. Eichungen rechts und links auf der Abb. — Beim Signal Injektion von 20 γ/kg Nicotin i. v. Starker Anstieg der Sinussättigung bei gleichzeitigem Blutdruckanstieg und mäßigem Anstieg der arteriellen Sättigung durch die atmungserregende Wirkung des Nicotins. — Für zeitliche Zuordnung ist die registrierte Kurve der Sinussättigung wegen der Latenzzeit in der Messung um etwa 10 sec nach links zu versetzen

Tonephin. Die bekannte vasoconstrictorische Wirkung des Vasopressins auf die Coronargefäße läßt erwarten, daß unter seiner Wirkung eine stärkere O_2-Ausnutzung des Coronarblutes eintritt. Wir gaben darum in unseren Versuchen das Tonephin, um die Versuchsanordnung auf ihre Zuverlässigkeit zu prüfen. Mit Regelmäßigkeit beobachteten wir nach Tonephin einen Abfall der O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes, der mehrere Minuten anhielt. Tonephin wurde in 6 Versuchen 10 mal gegeben. Dosierung: 0,042—0,17 Einheiten/kg. Die Abb. 5 gibt ein Beispiel für die Wirkung des Tonephins.

Effortil. Als Beispiel für ein Pharmakon mit sympathicomimetischer Wirkung untersuchten

wir das Effortil. Es wurde in 9 Versuchen 16mal gegeben. Dosierung: 0,17—0,5 mg/kg.

Es kam regelmäßig zu einem Anstieg der O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes und des Blutdruckes. Selbst bei schlechten Kreislaufverhältnissen (bei abgesunkenem Blutdruck gegen Versuchsende) wurde

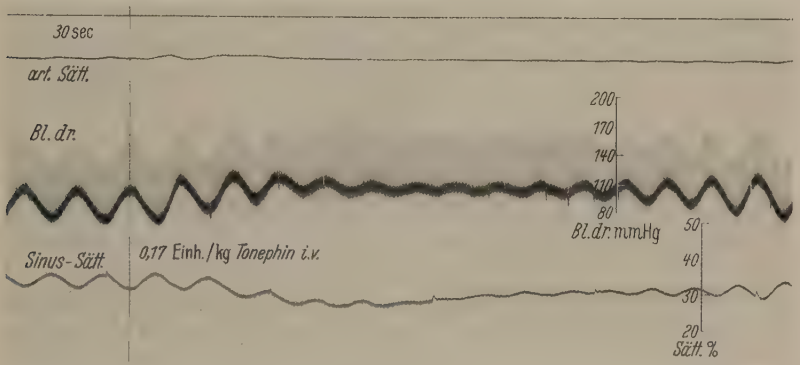


Abb. 5. Wirkung von Tonephin auf die O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes. Versuch vom 15. 6. 1955. Hund von 29,0 kg. Bezeichnungen wie bei Abb. 1. Eichungen rechts auf der Abb. Pumpenbeatmung mit O_2. — Beim Signal Injektion von 0,17 E/kg Tonephin i. v. Geringer Anstieg des Blutdruckes und Abfall der Sinussättigung. — Für zeitliche Zuordnung ist die registrierte Kurve der Sinussättigung wegen der Latenzzeit in der Messung um 8 sec nach links zu versetzen

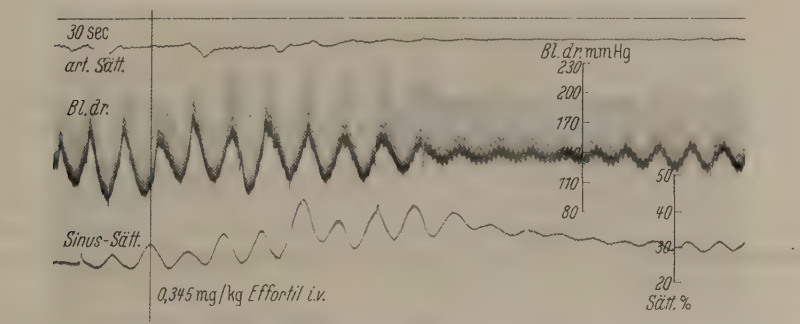


Abb. 6. Wirkung von Effortil auf die O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes. Versuch vom 15. 6. 1955. Hund von 29,0 kg. Bezeichnungen wie bei Abb. 1. Eichungen rechts auf der Abb. Pumpenbeatmung mit O_2. — Beim Signal Injektion von 0,345 mg/kg Effortil i. v. Mäßiger langdauernder Anstieg der Sinussättigung bei leichter Erhöhung des Blutdruckes. — Für zeitliche Zuordnung ist die registrierte Kurve der Sinussättigung wegen der Latenzzeit in der Messung um 8 sec nach links zu versetzen

nach Effortil bei Anstieg des Blutdruckes auch eine mehr oder weniger ausgeprägte Verbesserung der O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes beobachtet. Die Abb. 6 zeigt ein Beispiel für die Effortilwirkung bei noch gut erhaltenem Kreislauf.

Allgemein läßt sich an Hand der Erfahrungen in unseren Versuchen sagen, daß die Reaktionen auf die verschiedenen Pharmaka am besten zu beobachten waren, wenn der Blutdruck nicht wesentlich abgesunken

war. Es liegt nahe anzunehmen, daß die Reaktionsfähigkeit der Coronargefäße unter diesen Bedingungen noch gut erhalten ist. Solange ein normaler Blutdruck besteht, können die Coronargefäße einen Tonus beibehalten, der dem Blutbedarf des Herzmuskels unter den Versuchsbedingungen angepaßt ist. Tritt ein Absinken des Blutdruckes ein, so werden sich die Coronargefäße aus Gründen der Kompensation erweitern. Ein Pharmakon, das dilatatorisch wirkt, wird unter diesen Bedingungen nur noch einen geringen Effekt auf die Gefäßweite, den Strömungswiderstand und die O_2-Ausnutzung des Coronarblutes haben.

Besprechung der Befunde

Bei der Messung der O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes erfaßt man die Summe der Wirkungen mehrerer Faktoren auf die O_2-Versorgung des Herzmuskels. Für die Beurteilung der Wirksamkeit von coronargefäßaktiven Substanzen ist aber dieses gerade von Interesse, da der einfache Nachweis einer Steigerung der Coronardurchblutung noch nicht viel über die Versorgung des Herzmuskels aussagt. Andere Kreislaufwirkungen eines Pharmakons können durchaus nachteilige Folgen für die Versorgung des Herzmuskels haben. Ein Anstieg der Herzarbeit mit Steigerung des Stoffwechsels würde von sich aus eine höhere Durchblutung erfordern. Der Wirkungsgrad könnte absinken, so daß bei gleicher mechanischer Leistung Stoffwechsel und Blutbedarf erhöht wären. Etwaige Senkungen des Blutdruckes führen zu druckpassiver Minderung der Coronardurchblutung. Andererseits kann unter diesen Bedingungen die Herzarbeit geringer sein, sofern nicht aus Gründen der Kreislaufregulation das Herzminutenvolumen ansteigt. Auch rein mechanisch kann die Kontraktionskraft des Herzmuskels durch Kompression der Blutgefäße Einfluß auf die Coronardurchblutung gewinnen. Schließlich sind noch die Herzfrequenz und das Verhältnis von Systolen- und Diastolendauer als mögliche Faktoren zu nennen, welche die Größe der Coronardurchblutung mit beeinflussen.

Bei der Analyse der Wirkungen eines Pharmakons sollten eigentlich alle Größen, die von Einfluß sein können, gleichzeitig gemessen werden. Technisch ist diese Forderung jedoch kaum zu erfüllen. Auch besteht keine Übereinstimmung in der Auffassung, wie weit sich die verschiedenen Faktoren quantitativ auf die Coronardurchblutung auswirken, was sicherlich zum Teil durch verschiedene experimentelle Bedingungen verursacht ist. Eine gute, übersichtliche Darstellung dieser Fragen wurde vor kurzem von Katz, Katz u. Williams gegeben.

Da im Hinblick auf die O_2-Versorgung des Herzmuskels letztlich aber doch der Summeneffekt aller Änderungen, die durch ein Pharmakon ausgelöst werden, interessiert, haben wir uns experimentell auf die Messung der O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes beschränkt.

Papaverin. Die in unseren Versuchen beobachtete Erhöhung der O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes dürfte auf die durch Papaverin bedingte Mehrdurchblutung des Herzmuskels zurückzuführen sein.

Sie wurde von Essex, Wégria, Herrick u. Mann und Wégria, Essex, Herrick u. Mann für das Papaverin unter experimentellen Bedingungen, die den unsrigen vergleichbar sind, gefunden. Auch Eckenhoff u. Hafkenschiel fanden für das Papaverin bei i. v. Applikation in einer Dosierung von 15—20 mg für den Hund (vermutlich etwa 1 mg/kg) eine Zunahme der Coronardurchblutung von 61% im Mittel ohne wesentliche Änderungen im Blutdruck und in der Pulsfrequenz. Da ein Teil der Versuche dieser Autoren in Pentobarbital-Narkose durchgeführt ist, das schon von sich aus eine Mehrdurchblutung bewirken soll (Essex et al.), könnte der Papaverineffekt allein sogar noch stärker sein. (Wenn schon eine Mehrdurchblutung durch eine andere Substanz besteht, kann durchaus die Wirkung eines Pharmakons geringer sein, als ohne Vorbehandlung, zumal wenn die Angabe der Änderung in Prozent erfolgt.)

Die allgemeinen Kreislaufwirkungen des Papaverins sind in der von uns gewählten Dosierung gering. Ob man von einem nahezu spezifischen Effekt des Papaverins auf den Coronarkreislauf sprechen kann, ist jedoch nur zu sagen, wenn man die Änderungen im Strömungswiderstand verschiedener Gefäßgebiete miteinander vergleichen kann. Es könnte beispielsweise die Wirkung des Papaverins auf die Durchblutung ruhender und tätiger Organe unterschiedlich sein.

Euphyllin. Nach i. v. Injektion von Euphyllin konnten wir in unserer Versuchsanordnung keine wesentliche Erhöhung der O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes feststellen. In Abhängigkeit von der Dosis ergaben sich verschiedene Bilder. Der Effekt kann auch zweiphasisch sein. Es kann die anfängliche Steigerung der Sättigung von einer Erniedrigung gefolgt sein. Hierbei spielt offensichtlich die oft zu beobachtende Blutdrucksenkung eine Rolle. Auch ist eine fördernde Wirkung auf den Herzmuskel in Betracht zu ziehen, welche eine Stoffwechselsteigerung verursachen kann (Boyer u. Green). (Eine ausführliche Diskussion der Wirkung der Xanthine auf den Coronarkreislauf findet sich bei Wégria.)

Foltz, Rubin, Steiger u. Gazes untersuchten die Kreislaufwirkungen des Aminophyllins (= Euphyllin) und seinen Einfluß auf die arteriovenöse Sauerstoffdifferenz des Coronarblutes im Tierexperiment. Sie benutzten die N_2O-Methode (Kety u. Schmidt) zur Messung der Coronardurchblutung (Goodale et al.), wodurch ein zeitlicher Abstand von etwa 30 min zwischen Kontrolle und Gabe des Pharmakons bedingt war. Nach Aminophyllin (4 mg/kg) wurden von ihnen keine signifikanten Erhöhungen der Coronardurchblutung beobachtet. Dagegen war die Herzarbeit und die O_2-Aufnahme des Herzens erhöht. Es fand sich in diesen Versuchen eine erhöhte arteriovenöse Sauerstoffdifferenz für das Coronarblut. Der O_2-Gehalt des Blutes wurde durch van-Slyke-Analysen bestimmt. Die Blutentnahmen erfolgten 1 min und jede 4. min nach der Injektion, insgesamt 3 –4 Entnahmen. Im Mittel ergab sich eine Abnahme der O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes um 12 Sätt.% nach Aminophyllin. Bei der Entnahme von einzelnen Blutproben erscheint es uns möglich, daß die anfängliche Zunahme der O_2-Sättigung des

Coronarsinusblutes nicht oder nur teilweise erfaßt wurde. Im wesentlichen besteht aber eine Übereinstimmung der Befunde mit unseren Ergebnissen.

Coffein ergab bei der niederen Dosierung (bis zu 5 mg/kg) keine ausgesprochenen Wirkungen auf die O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes. Höhere Dosierungen erschienen uns nicht von wesentlichem Interesse. (10 mg/kg würden 0,7 g am Menschen [70 kg] entsprechen; mit dieser Dosis treten stärkere zentralnervöse Effekte auf.)

Zur Frage einer Wirkung des Coffeins auf den O_2-Verbrauch des Herzmuskels vgl. Kiese u. Gummel: In Versuchen am Herz-Lungen-Präparat wurde eine Steigerung der Herzfrequenz und des Sauerstoffverbrauches beobachtet.

Strophanthin. In unseren Versuchen sahen wir keinen Einfluß des Strophanthins auf die O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes. Es kann aber sein, daß unsere Beobachtungszeiten (bis zu 10 min) noch zu kurz waren.

In ihren Untersuchungen über das Verhalten der Coronardurchblutung nach Strophanthin fanden Hildebrandt u. Osterwald eine Abhängigkeit der Coronardurchblutung vom Verhalten des Herzminutenvolumens (gleichsinniges Verhalten). Diese Befunde sprechen wohl für eine Anpassung der Coronardurchblutung an den Bedarf des Herzmuskels nach Strophanthin, so daß auch aus diesem Grunde stärkere Änderungen in der O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes nicht zu erwarten sind. Page u. Mitarb. sahen in ihren Versuchen allerdings eine Zunahme der arteriovenösen Sauerstoffdifferenz des Coronarblutes nach Strophanthin.

Nicotin. Die starke Zunahme der O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes nach i. v. Injektion von Nicotin ist wahrscheinlich durch eine Sympathicuserregung und Adrenalinausschüttung bedingt.

Auch Wégria weist auf die Ähnlichkeit der Nicotinwirkung mit der Adrenalinwirkung hin (Erhöhung von Blutdruck und Coronardurchblutung am ganzen Tier durch Nicotin; unveröffentlichte Befunde von Wégria). Im Gegensatz dazu fand Kountz eine Abnahme des coronaren Durchflusses durch Nicotin. Bülbring, Burn u. Walker nehmen an, daß es unter Nicotin auch zu einer Abgabe von Hypophysenhinterlappenhormon kommt, was für die coronarkonstriktorische Wirkung des Nicotins eine Rolle spielen soll. Schofield u. Walker beobachteten dagegen am Herzen in Verbindung mit dem Körperkreislauf nach Nicotin Zunahme der Coronardurchblutung und Blutdrucksteigerung. (Versuche am Hund; Perfusion eines Zweiges der linken Coronararterie mit Blut desselben Hundes unter konstantem Druck.) Diese Befunde können zur Erklärung der von uns beobachteten Erhöhung der O_2-Sättigung im Coronarsinusblut durch Nicotin herangezogen werden. Größere Abgaben von Hypophysenhinterlappenhormon (entsprechend den Annahmen von Bülbring, Burn u. Walker) müßten eher zu einer Abnahme der Sättigung im Coronarsinusblut führen (siehe Tonephin).

Tonephin. Die bekannte vasoconstrictorische Wirkung des Tonephins führt zu einer Abnahme der O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes. Wir benutzten es in unseren Experimenten, um die Zuverlässigkeit der Versuchsanordnung zu überprüfen. Da die O_2-Ausnutzung des Coronarblutes im allgemeinen schon sehr hoch ist, kann zusätzlich keine erhebliche Steigerung der Ausnutzung eintreten. Jede Mangeldurchblutung wird auch zur Ansammlung von Stoffwechselprodukten führen und damit eine Gegenregulation auslösen. So nimmt es nicht Wunder, daß die

Abnahmen der O_2-Sättigung gering sind. Durch die fortlaufende Messung sind sie aber zu erfassen. Bei Entnahme von einzelnen Blutproben würde es vermutlich schwierig sein, in diesem Fall signifikante Unterschiede zu finden. (Zumindest läßt sich der zeitliche Verlauf einer Reaktion besser beurteilen. Es ist auch leichter festzulegen, zu welchem Zeitpunkt etwaige Blutproben [z. B. für Stoffwechselfragen] zu entnehmen sind.) Ob es nun unter Einwirkung des Tonephins tatsächlich zu einer Mangeldurchblutung kommt, ist nur zu beurteilen, wenn nähere Angaben über Herzarbeit, O_2-Aufnahme des Herzmuskels und etwaige Änderungen in der chemischen Zusammensetzung von arteriellem und venösem Blut des Herzens (z. B. Utilisation von Glucose und Milchsäure, Änderungen im p_H) vorliegen. Vielleicht kann auch das Tonephin (neben dem allgemeinen O_2-Mangel durch Einatmung von O_2-Mangel-Gemischen) dazu benutzt werden, um die „kritischen Werte" für die venöse O_2-Spannung für das Herz festzulegen.

Effortil. Über die Wirkung der physiologischen Wirkstoffe des sympathischen Systems (Adrenalin, Nor-Adrenalin) auf die O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes wurde bereits in der voraufgegangenen Mitteilung berichtet. Als ein Beispiel für die in der Therapie benutzten und länger wirksamen Sympathicomimetica untersuchten wir das Effortil. Die auftretenden Blutdrucksteigerungen und Zunahmen der O_2-Sättigung des Coronarsinusblutes hielten mehrere Minuten an. Eine weitere Überprüfung der Sympathicomimetica unter dem Gesichtspunkt der O_2-Versorgung des Herzmuskels erscheint uns angezeigt, da diesen Pharmaka bekanntlich eine Rolle in der Therapie des Kreislaufschocks beim akuten Coronarinfarkt zukommt. Von Binder u. Mitarb. wird z. B. für diesen Zweck das Nor-Adrenalin empfohlen. (Weitere klinische und tierexperimentelle Untersuchungen siehe Gazes u. Mitarb. und Gootnick u. Knox.)

Summary

The action of drugs on the oxygen saturation of the coronary sinus blood was studied in anesthetized, closed chest dogs. Coronary sinus blood was continuously drawn by a pump through a catheter. The oxygen saturation was determined by use of the oxymeter of Kramer.

The oxygen saturation of the coronary sinus blood was definitely increased following the intravenous injection of papaverine and nicotine, moderately increased by Effortil and transiently by Euphyllin (Aminophyllin). Coffeine had a small effect, but only in higher dosage. Strophanthine was without any observable action. There was a decrease of the oxygen saturation of the coronary sinus blood by Tonephin (corresponding to Pitressin).

Fräulein I. Kuhn, Fräulein B. Preusse und Fräulein E. Westphal danken wir für die technische Mitarbeit bei den Versuchen.

Literatur

Binder, M. J., J. A. Ryan jr., St. Marcus, F. Mugler jr., D. Strange and Clarence M. Agress: Amer. J. Med. **18**, 622 (1955). — Boyer, N. H. and H. D. Green: Amer. Heart J. **21**, 199 (1941). — Bülbring, E., J. H. Burn and J. M. Walker: Quart. J. Med. **18**, 73 (1949). — Eckenhoff, J. E., and J. H. Hafkenschiel: J. Pharmacol. a. Exp. Ther. **91**, 362 (1947). — Essex, H. E., R. Wégria, J. F. Herrick and F. C. Mann: Amer. Heart J. **19**, 554 (1940). — Foltz, E. L., A. Rubin, W. A. Steiger and P. C. Gazes: Circulation (New York) **2**, 215 (1950). — Gazes, P. C., L. J. Goldberg and Th. D. Darby: Circulation (New York) **8**, 883 (1953). — Goodale, W. T., M. Lubin, J. E. Eckenhoff, J. H. Hafkenschiel and W. G. Banfield: Amer. J. Physiol. **152**, 340 (1948). — Gootnick, A., and F. H. Knox: Circulation (New York) **7**, 511 (1953). — Hildebrandt, F., u. K. H. Osterwald: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **190**, 209 (1938). — Katz, A. M., L. N. Katz and Francis L. Williams: Amer. J. Physiol. **180**, 392 (1955). — Kety, S. S., and C. F. Schmidt: J. Clin. Invest. **27**, 476 (1948). — Kiese, M., u. H. Gummel: Klin. Wschr. **1938**, 927. — Kountz, W. B.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **45**, 65 (1932). — Kramer, K.: Abderhaldens Hdb. d. Biol. Arb.-Meth. Abt. V, Teil 8, S. 1085. — Lochner, W., H. Mercker u. E. Schürmeyer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (im Druck). — Osterwald, K. H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **190**, 535 (1938). — Page, R. G., E. L. Foltz, W. F. Sheldon and H. Wendel: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **101**, 112 (1951). — Schofield, Brenda M., and J. M. Walker: J. of Physiol. **122**, 489 (1953). — Wégria, R.: Pharmacol. Rev. **3**, 197 (1951). — Wégria, R., H. E. Essex, J. F. Herrick and F. C. Mann: Amer. Heart J. **20**, 557 (1940).

Prof. H. Mercker, Pharmakologisches Institut der Universität Göttingen, Geiststr. 9

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 383—392 (1956)

Aus den pharmakologischen Laboratorien der Firma Dr. Karl Thomae GmbH

Die pharmakologischen Wirkungen des 2-(p-Butoxyphenyl)-2-(Tetrahydro-1,4-Oxazinomethyl)-Dioxolan-(1,3)-Methylbromids (Q 160)

Von

R. KADATZ und H. KLUPP

Mit 4 Textabbildungen

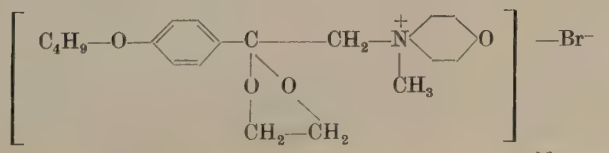
(Eingegangen am 3. Oktober 1955)

Bei der pharmakologischen Untersuchung einer Reihe von quaternären Phosphoniumverbindungen fanden GINZEL u. Mitarbeiter[5] im Pentamethylenbistriphenylphosphoniumbromid (Q 11) einen Körper, dessen ganglienblockierende Wirkung in niedrigen Dosen zunächst nur die vagalen Ganglien betraf, während die Erregungsübertragung in sympathischen Ganglien erst bei weit höherer Dosierung beeinflußt wurde. Doch zeigte die Substanz schon in einer Dosis, die nur etwa dreimal höher als die vagal ganglienblockierende war, eine lähmende Wirkung auf die neuromuskuläre Erregungsübertragung (GINZEL u. Mitarbeiter)[4]; eine praktische Verwendung von Q 11 schien daher mit einem zu großen Risiko belastet.

Die Suche nach brauchbareren Ganglienblockern führte bei der Vortestung von etwa 50 Körpern aus verschiedenen Verbindungsklassen zu einer Substanz, deren Eigenschaften einer eingehenden Untersuchung wert schienen, zumal die Verbindung für die pharmakologische Analyse des autonomen Nervensystems praktische Bedeutung gewinnen könnte. Denn der Abstand zwischen den Dosen, die die vagalen Ganglien einerseits und die sympathischen Ganglien und neuromuskulären Endplatten andererseits blockieren, ist weit genug, um eine gezielte Ausschaltung zu ermöglichen.

Chemisch handelt es sich bei dieser Substanz um 2-(p-Butoxyphenyl)-2-(tetrahydro-1,4-oxazinomethyl)-dioxolan-(1,3)-methylbromid (Q 160).

Formel



Methodik

An Katzen in Chloralosenarkose (90 mg/kg, intravenös) wurden verschiedene der in der Folge angeführten Funktionen gleichzeitig registriert:

Blutdruck aus A. femoralis oder A. carotis mittels Hg-Manometer. Reizung des Halsvagus (Reizserien von 5 sec Dauer, Dauer des Einzelimpulses 10 msec, Pausendauer zwischen den Impulsen 10 msec). Zwischen den Reizserien wurde eine Pause von 2 min eingeschaltet.

Nickhautkontraktionen bei Reizung der präganglionären Fasern des Halssympathicus in gleicher Art wie bei Vagusreizung.

In den meisten Versuchen wurde der Vagus rechts und der Sympathicus links mit je 1 Pol des Reizgerätes verbunden und somit unipolar gereizt. Auf diese Weise gelang es, gleichzeitig den Blutdruckabfall durch Vagusreiz und die Nickhautkontraktionen auszulösen. In einzelnen Versuchen reizten wir Vagus und Sympathicus einer Seite ungetrennt gemeinsam.

Zur Reizung des *N. splanchnicus* wurde der linke Nerv im Abdomen auf gedeckte Elektroden gelagert und mit Rechteckimpulsen von 10 msec Impulsdauer und 10 msec Pause 10 sec lang gereizt.

Der *Carotissinusreflex* wurde durch Abklemmung beider Halsschlagadern ausgelöst.

Die *Darmmotorik* registrierten wir mittels eines dünnwandigen in den Dünndarm eingebundenen Gummiballons. Die Druckänderungen wurden über ein Wassermanometer auf einen Pistonrecorder übertragen.

Die direkten Wirkungen von Q 160 auf das Herz wurden am isoliert durchströmten Froschherzen nach Bülbring[2] untersucht. Ferner haben wir Q 160 am Starlingschen Herz-Lungen-Präparat geprüft.

Neuromuskuläre Wirkungen prüften wir am N. gastrocnemius, der vom peripheren Stumpf des durchtrennten N. ischiadicus her mit supramaximalen Einzelimpulsen (Rechteckimpulse), 10 msec Impulsdauer, Frequenz 6/min, gereizt wurde. Außerdem wurde die neuromuskuläre Wirkung am isolierten Rattenzwerchfell untersucht[3].

Ferner wurde der Einfluß von Q 160 auf die Blutdruckwirkung von Pilocarpin (20—30 γ/kg), Acetylcholin (1—3 γ/kg), Nicotin (25—50γ/kg) und Adrenalin (2—4 γ/kg) geprüft. Alle Injektionen erfolgten in die Femoralvene.

An Ratten wurde die Hemmung der Magensaftsekretion nach der Methode von Shay[14] geprüft. Dazu wurde den Tieren 24 Std vor Versuchsbeginn das Futter entzogen. In leichter Äthernarkose wurde der Pylorus ligiert. Gleichzeitig erhielten die Ratten die Testsubstanz subcutan oder in einzelnen Versuchen intraduodenal injiziert. In einigen Versuchen wurde nur die halbe Dosis Q 160 verabreicht und der Rest $2^1/_2$ Std später nachinjiziert. 5 Std nach der Pylorusligatur töteten wir die Tiere durch intracardiale Chloroforminjektion und bestimmten die Magensaftmenge sowie die darin enthaltene Salzsäure. Die in den Ergebnissen angeführten Werte stellen die Mittel aus Gruppen von jeweils 10 Tieren dar.

Der Einfluß von Q 160 auf die Speichelsekretion wurde an Katzen in Chloralosenarkose untersucht. Dazu führten wir in den Ausführungsgang der Gl. submandibularis eine Plastikkanüle ein und reizten die Chorda Tympani (Reizfrequenz 50 Hz, Impulsdauer 10 msec, Impulsstärke 1—3 mA). Die Reizdauer betrug jeweils 10 sec. In einzelnen Versuchen wurde die Speichelsekretion durch intravenöse Injektionen von Pilocarpin (20 γ/kg) oder Carbaminoylcholin (8 γ/kg) ausgelöst.

Spasmolytische Wirkungen prüften wir am isolierten Meerschweinchendünndarm. Die Darmstücke wurden in Warmblütertyrodelösung bei 37° C gehalten.

Die Kontraktursubstanzen $BaCl_2$, Histamin, Acetylcholin und Nicotin wirkten jeweils 30 sec lang auf das Darmstück ein. Die Hemmkörper wurden 1 min im Bad belassen und anschließend ohne Auswaschen die Kontraktursubstanz zugesetzt. Aus jeweils mindestens 2 Dosen des Hemmkörpers wurde graphisch jene Konzentration bestimmt, welche die Verkürzung des Darmstückes durch die Kontraktursubstanzen auf die Hälfte einschränkt. Jedes Ergebnis stammt aus mindestens 3 Parallelversuchen. Die spasmolytische Wirksamkeit von Q 160 wurde ferner am Meerschweinchendünndarm in situ nach der Methode von Straub und Viaud[15] geprüft: In eine Dünndarmschlinge der mit Urethan (1 g/kg) narkotisierten Meerschweinchen wurde eine Plastikkanüle eingebunden, das Darmstück etwa 5 cm weiter oralwärts abgebunden und mit einer Injektionsspritze die zur Auslösung von Peristaltikwellen notwendige Flüssigkeitsmenge bestimmt.

Zur Prüfung der Darmwirkung an nicht-narkotisierten Tieren verwendeten wir 2 Hunde mit einer Thiry-Vellafistel. Die Darmtätigkeit wurde mit einem Ballon aus Kodomgummi über ein Wassermanometer mit einem Pistonrecorder registriert.

Den Einfluß von Q 160 auf den Bronchospasmus prüften wir in einer Modifikation der Methode von Konzett und Rössler[8] am Meerschweinchen. An Stelle des Hg-Manometers wurde zur Entleerung des Pistonrecorders die Gummimembran einer Mareyschen Kapsel verwendet. Der Spasmus wurde durch intravenöse Injektion von Acetylcholin in Dosen von 5—10 γ/kg ausgelöst.

Ergebnisse

Ganglienblockierende Wirkung. In Versuchen an Katzen wird die Blutdrucksenkung nach elektrischer Halsvagusreizung bereits durch 0,3 mg/kg Q 160 (intravenös) für 5—10 min aufgehoben. Ebenso wird die erregende Wirkung der Vagusreizung auf die Darmmotorik durch diese Dosen aufgehoben. Die Vagusblockierung dauert nach Dosen von über 1 mg/kg meist mehr als 20 min an (Abb. 1).

Die blutdrucksenkende Wirkung kleiner Acetylcholindosen wird durch diese niedrigen den Vagus blockierenden Q 160-Dosen nicht beeinflußt. Dagegen wird die blutdrucksenkende Wirkung von Pilocarpin unterdrückt.

Nach 1—3 mg/kg Q 160 wird die blutdrucksteigernde Wirkung von Nicotin vollkommen aufgehoben. Im Gegensatz zur anhaltenderen Vagusblockierung kehrt die Nicotinwirkung nach solchen Dosen bereits nach etwa 10 min wieder zurück.

Etwa parallel mit der Aufhebung der Nicotinwirkung scheint auch der blutdrucksenkende Effekt des Acetylcholins etwas vermindert. Jedoch erschwert die bei diesen Dosen bereits auftretende Blutdrucksenkung, die für den Acetylcholineffekt eine veränderte Ausgangslage schafft, eine exakte Angabe über die Acetylcholinbeeinflussung. Sobald der Blutdruck seine Ausgangshöhe wieder erreicht hat, ist die Acetylcholinwirkung wieder voll auslösbar, während eine Vagushemmung noch vorhanden ist.

Die gleichen Dosen von 1—3 mg/kg Q 160 schwächen auch den pressorischen Carotissinus-Entlastungsreflex ab.

Bei weiterer Erhöhung der Dosis von Q 160 werden die Nickhautkontraktionen nach elektrischer Halssympathicusreizung auf etwa 50% der Ausgangshöhe eingeschränkt (Abb. 2), und die Blutdrucksteigerung nach Reizung des N. splanchnicus in etwa dem gleichen Ausmaß

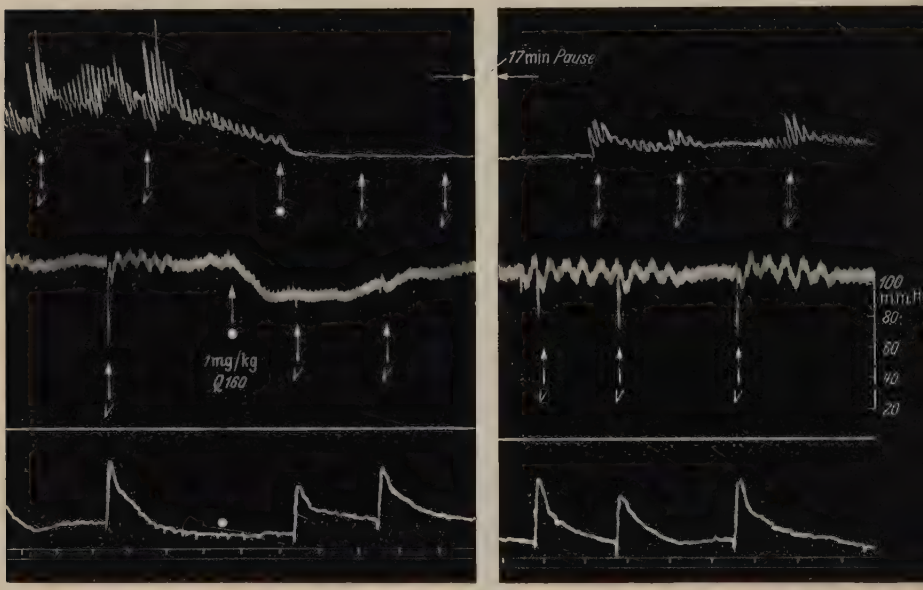


Abb. 1. Katze, 3,0 kg, Chloralosenarkose. Untere Kurve: Nickhautkontraktionen bei Reizung des Halssympathicus. Mittlere Kurve: Blutdruck in mm Hg. Obere Kurve: Dünndarmmotorik. Bei V. Reizung des Halsvagus und des Sympathicus. Injektion von 1 mg/kg Q 160. Zeit in Minuten

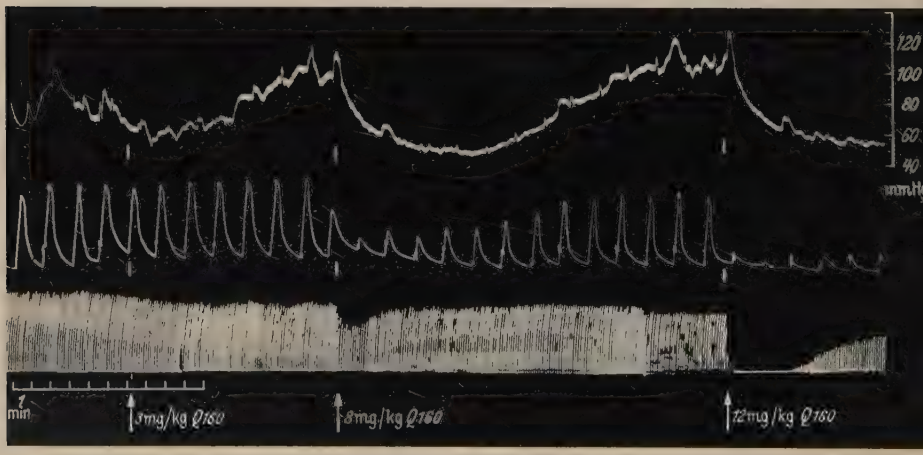


Abb. 2. Katze, 3,4 kg, Chloralosenarkose. Obere Kurve: Blutdruck in mm Hg. Mittlere Kurve: Nickhautkontraktionen. Untere Kurve: Kontraktionen des M. gastrocnemius bei Reizung des N. ischiadicus. Injektion von 3, 8 und 12 mg/kg Q 160. Zeit in Minuten

verringert. Auch der Carotissinusreflex wird durch die den Sympathicus blockierenden Dosen von Q 160 aufgehoben.

Kreislauf- und Herzwirkung. Q 160 verursacht besonders in höheren Dosen eine vorübergehende Senkung des arteriellen Mitteldruckes. Das Ausmaß der Blutdrucksenkung an Katzen unterliegt bei den einzelnen Tieren beträchtlichen Schwankungen. In der Mehrzahl der Versuche war bei einer Dosis von weniger als 500 γ/kg keine oder nur eine geringe Blutdrucksenkung von etwa 20 mm Hg festzustellen. Die Wirkung klingt in jedem Falle, auch wenn ein Tier besonders gegen Q 160 empfindlich ist, innerhalb von 3—5 min wieder ab. Mit steigenden Dosen nimmt das Ausmaß der Blutdrucksenkung zu und beträgt nach 2 bis 3 mg/kg meist 60—80 mm Hg.

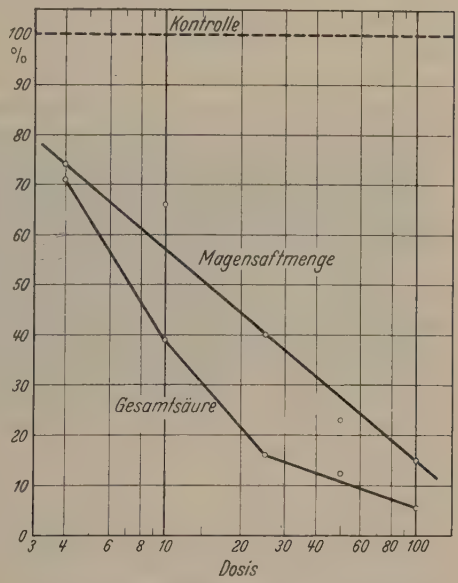


Abb. 3. Magensaftsekretion an „SHAY"-Ratten. Abscisse: Dosis von Q 160 in mg/kg. Ordinate: Magensaftmenge und Gesamtsäure (= Magensaftmenge · Säurekonzentration) in Prozent der Kontrollgruppen

Bei Hunden bewirkt Q 160 eine Steigerung der Herzfrequenz, die nach Dosen von 1 mg/kg bis zu 60—80% beträgt. Es scheint sich auch hier um eine Folge der Vagusblockade zu handeln, denn am isoliert durchströmten Froschherzen hat Q 160 bis zu einer Konzentration von 500 γ/cm^3 in der Durchströmungsflüssigkeit keinen Einfluß auf Minutenvolumen und Frequenz. Den gleichen Befund konnten wir am Starlingschen Herz-Lungen-Präparat erheben, an dem ebenfalls keine Änderung des Schlagvolumens oder der Frequenz eintritt, wenn Q 160 bis zu Dosen von 20 mg in den venösen Schenkel injiziert wird.

Neuromuskuläre Wirkung. Wie die meisten quaternären Verbindungen hat auch Q 160 in hohen Dosen lähmende Wirkungen auf die neuromuskuläre Erregungsübertragung. Eine Einschränkung der Muskelkontraktionen auf indirekte Reize tritt erst nach Dosen über 8 mg/kg ein, doch sind zu einer vollständigen Lähmung des N. gastrocnemius Dosen von etwa 12 mg/kg Q 160 notwendig (Abb. 2). Selbst nach diesen hohen Dosen von Q 160 ist die Spontanatmung noch ausreichend, so daß das Tier ohne künstliche Beatmung am Leben blieb.

Am isolierten Rattenzwerchfell zeigt Q 160 nur ein Dreißigstel der muskellähmenden Wirkung von d-Tubocurarin.

Wegen der starken Wirkung von Q 160 auf Vaguseffekte untersuchten wir, ob diese Substanz auch andere unter dem Einfluß des Parasympathicus stehende Funktionen verändert.

Magensaft. Den in 5 Std produzierten Magensaft schränkt Q 160 bei subcutaner Zufuhr in einem Dosenbereich von 5—100 mg/kg um 20—70% gegenüber den unbehandelten Kontrollgruppen ein. Dabei nimmt nicht nur die Magensaftmenge ab, sondern auch die Säurekonzentration (Abb. 3).

In zwei Versuchsreihen wurde Q 160 in Mengen von 25, 50 und 100 mg nach der Pylorusligatur in das Duodenum injiziert und dann das Abdomen verschlossen. Auch unter diesen Bedingungen war eine Verringerung der Magensaftmenge festzustellen; nach 50 mg/kg wurde etwa die Hälfte des bei den Kontrollgruppen gebildeten Magensafts produziert.

Speichelsekretion. Der durch Reizung der Chorda Tympani an der Katze auslösbare Speichelfluß kann durch Q 160 in vagusblockierenden Dosen ab 300 γ/kg gehemmt werden. Ebenso wird auch die durch intravenöse Pilocarpin-Injektion (20—25 γ/kg) bewirkte Speichelsekretion von 3—3,3 cm^3/10 min vorübergehend aufgehoben. Hingegen wird die durch Carbaminoylcholin (10 γ/kg) verursachte Speichelabgabe durch die gleiche Menge von Q 160 nur in ihrem Ausmaß verringert.

Tabelle 1

Spasticum	Spasmolyticum	Relative Wirksamkeit von Q 160 im Vergleich zum Spasmolyticum
Acetylcholin	Atropin	1/60
Histamin	Dimethylamino-äthylbenzhydryläther	1/130
Bariumchlorid	Papaverin	2,5
Nicotin	Hexamethonium	25

Spasmolytische Wirkung. Am isolierten Meerschweinchendünndarm untersuchten wir die durch Nicotin, Acetylcholin, Histamin und Bariumchlorid ausgelösten Kontrakturen. Als Vergleichssubstanzen wurden bei den Nicotinversuchen Hexamethonium, bei Acetylcholin Atropin, bei Histamin der Dimethylaminoäthyl-benzhydryläther und bei Bariumchlorid Papaverin verwendet. In der nachfolgenden Tabelle ist die relative Wirksamkeit von Q 160 bezogen auf die spezifischen Antagonisten angegeben.

Die spasmolytische Wirkung ist auch am Meerschweinchendünndarm in situ nachweisbar. In der Anordnung von Straub und Viaud[15] zeigt sich, daß das zur Auslösung der Peristaltik notwendige Füllungsvolumen nach einer Dosis von etwa 300 γ/kg verdoppelt werden muß. Nach höheren Dosen von Q 160 (1 mg/kg) sistiert die Peristaltik vollkommen.

In den Versuchen an narkotisierten Katzen war sowohl die Spontanperistaltik als auch die nach Vagusreizung gesteigerte Darmtätigkeit zu beeinflussen (Abb. 1).

An Hunden mit Thiry-Vellafistel vermindert Q 160 in Dosen von 0,5—1 mg/kg deutlich die normale Darmperistaltik. Nach höheren

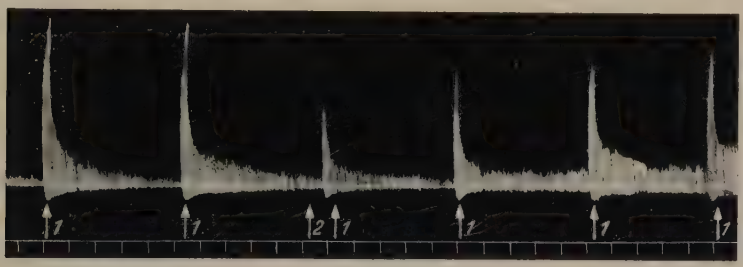


Abb. 4. Meerschweinchen, 565 g, Bronchospasmus nach Injektion von 10 γ/kg Acetylcholin (1), 10 γ/kg Q 160 (2)

Dosen wird der Darm vollkommen ruhiggestellt. Die Wirkung dauert nur etwa 10 min an. Wir konnten jedoch zeigen, daß die Steigerung der Darmmotorik, wie sie z. B. nach Reserpin eintritt, durch Q 160 unterdrückt werden kann, und zwar für die Dauer dieser Reserpinwirkung.

Bronchospasmus. Wie Abb. 4 zeigt, läßt sich der durch Acetylcholin ausgelöste Bronchospasmus durch eine Dosis von 10 γ/kg Q 160 etwa auf die Hälfte herabsetzen. Höhere Dosen verhindern die Bronchialwirkung von Acetylcholin vollkommen.

Tabelle 2

Art der Zufuhr	DL 50	Vertrauensgrenze (P = 0,05)	Tierzahl
s. c.	0,13 g/kg	0,096—0,19	30
p. o.	1,4 g/kg	1,11 —1,36	40
i. p.	0,08 g/kg	0,07 —0,10	40

Toxicitätsbestimmung. Die DL 50 wurde an Gruppen von jeweils 10 Mäusen bei verschiedenen Zuführungsarten bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte nach der Methode von Litchfield und Wilcoxon[9].

Chronische Toxicität. Zur Bestimmung der chronischen Toxicität wurde Q 160 (in Tylose aufgeschlämmt) in einer Dosierung von 100 mg/kg peroral und von 50 mg/kg subcutan täglich durch 3 Monate jeweils 10 Ratten zugeführt. 10 Tiere dienten als Kontrollen. Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Tiere wöchentlich gewogen. Die Gewichtskurven der behandelten und der Kontrolltiere verliefen vollkommen parallel.

Im Blutbild war eine leichte Linksverschiebung der neutrophilen Leukocyten festzustellen. Sonst bestanden keine Unterschiede zu den Blutbildern der Kontrolltiere. Bei den subcutan injizierten Tieren traten nach einiger Zeit an den Injektionsstellen Nekrosen auf, die aber beim Wechsel der Injektionsstelle wieder abheilten. Die histologische Untersuchung der Organe ergab keine pathologischen Veränderungen, die auf die verabreichte Substanz zurückgeführt werden könnten.

Besprechung der Versuchsergebnisse

Ganglienblockierende Stoffe vom Typ des Hexamethoniums und Tetraäthylammoniums lähmen sowohl die sympathischen als auch die parasympathischen Ganglien. Dementsprechend treten neben Zeichen der Sympathicusblockade wie Blutdruckabfall, Störung der Kreislaufreflexe und Erweiterung der Gefäße auch solche der Vaguslähmung, z. B. Trockenheit im Mund und Pupillenerweiterung auf. Unterschiede in der Empfindlichkeit der Ganglien beider Teile des autonomen Nervensystems wurden bei den genannten Substanzen nicht beobachtet. Wick[16] konnte zeigen, daß die von ihm untersuchte quartäre Substanz Buscopan ganglionär blockierende Wirkungen besitzt, die hauptsächlich vagale Ganglien betreffen.

Bei kleinen Dosen unserer Substanz Q 160 steht im Vordergrund des Wirkungsbildes die Hemmung des Reizeffektes parasympathischer Nerven. So werden der Blutdruckabfall auf Vagusreiz und die Speichelsekretion auf Chordareiz durch Dosen von Q 160 blockiert, die um ein Vielfaches unter den die Sympathicuswirkung hemmenden liegen. Da die Acetylcholinwirkung auf den Blutdruck in diesem Dosenbereich noch erhalten bleibt, muß der Angriffspunkt von Q 160 an den vagalen Ganglien liegen. Die hohe Wirksamkeit von Q 160 gegen Pilocarpin stellt keinen unbedingten Widerspruch gegen diese Annahme dar. Denn, wenn auch gewisse muscarinartige Effekte der Pilocarpinwirkung in der Peripherie verursacht werden, so weisen verschiedene Befunde auch auf eine ganglionäre Wirkungskomponente hin[1, 11].

Für einen ganglionären Angriffspunkt der Q 160-Wirkung spricht auch die Tachycardie, die wir an Hunden beobachteten. Sie scheint, ähnlich wie nach Atropin, durch eine Enthemmung der sympathischen Innervation zustandezukommen. Eine direkte Wirkung von Q 160 auf das Herz war weder am durchströmten Froschherzen noch am Starlingschen Herz-Lungen-Präparat nachweisbar.

Während vagale Erregungen nach Pilocarpin bereits durch niedrige Dosen von Q 160 herabgesetzt werden, können die blutdrucksteigernden Wirkungen z. B. von Nicotin, die durch Erregung sympathischer Ganglien bedingt sind, erst durch Dosen von mehr als 1 mg/kg Q 160 beeinflußt werden. Die Nicotinwirkung erweist sich dabei beträchtlich empfindlicher als die des physiologischen Überträgermechanismus, denn die Unterbrechung der Nervenreize auf die Nickhaut gelingt erst in bedeutend höheren Dosen. Unsere Ergebnisse stehen in Parallele zu Beobachtungen von Kewitz [6, 7], der festgestellt hat, daß in sympathischen Ganglien die Übertragung von Erregungen, die durch Nervenreize ausgelöst sind, schwerer zu unterdrücken ist als die Erregung von Ganglien auf chemischem Wege durch exogen zugeführte Stoffe.

Q 160 besitzt neben der ganglienblockierenden Wirkung noch eine spasmolytische Komponente, die sich am isolierten Darm nachweisen läßt. Obwohl auch dort die Antinicotinwirkung, also die ganglienblockierende Wirksamkeit, weit im Vordergrund steht, war auch die Bariumkontraktur in relativ niedriger Dosierung zu verhindern. Q 160 erwies sich dabei unter unseren Versuchsbedingungen als doppelt so wirksam wie Papaverin. Die spasmolytische Wirkung muß wohl auch zur Erklärung der Verhinderung des Bronchospasmus nach Acetylcholin herangezogen werden.

Die hohe Spezifität der Wirkung auf vagale Ganglien, die Q 160 in einem weiten Dosenbereich besitzt, unterscheidet also diese Substanz von den bereits bekannten Ganglienblockern. Im Vergleich zu Pentamethylen-bis-triphenylphosphoniumbromid tritt bei Q 160 die Muskellähmung weit in den Hintergrund.

Zusammenfassung

Das 2-(p-Butoxyphenyl)-2-(tetrahydro-1,4-oxazinomethyl)-dioxolan-(1,3)-methylbromid (Q 160) unterbricht die Erregungsübertragung in autonomen Ganglien. Bei niedriger Dosierung werden alle durch elektrische Vagusreizung oder Pilocarpin ausgelösten Erregungen vagaler Ganglien unterdrückt, ohne daß der Acetylcholineffekt oder die Funktion sympathischer Ganglien merklich beeinflußt werden. Erst bei hoher Dosierung wird auch die Erregungsübertragung in sympathischen Ganglien und neuromuskulären Endplatten herabgesetzt. Daneben besitzt die Substanz noch spasmolytische Wirkungen auf die glatte Muskulatur.

Literatur

[1] Ambache, N.: J. of Physiol. **110**, 164 (1949). — [2] Bülbring, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **152**, 257 (1930). — [3] Bülbring, E.: Brit. J. Pharmacol. **1**, 38 (1946). — [4] Ginzel, K. H., H. Klupp, O. Kraupp u. G. Werner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 173 (1953). — [5] Ginzel, K. H., H. Klupp, O. Kraupp, u. G. Werner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 336 (1954). — [6] Kewitz, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 323 (1954). — [7] Kewitz, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 111 (1955). — [8] Konzett, H., u. R. Rössler: Arch. exper.

Path. u. Pharmakol. **195**, 71 (1940). — [9] Litchfield, J. T., and F. Wilcoxon: J. of Pharmacol. **95**, 99 (1949). — [10] Moe, G. K., and W. A. Freyburger: J. of Pharmacol. **98**/II, 61 (1950). —[11] Paton, W. D. M., and E. J. Zaimis: Brit. J. Pharmacol. **6**, 155 (1951). — [12] Paton, W. D. M., and E. J. Zaimis: Brit. J. Pharmacol. **6**, 155 (1951). — [13] Paton, W. D. M., and E. J. Zaimis: Pharmacol. Rev. **4**, 219 (1952). — [14] Shay, H., S. A. Komarov, S. S. Fels, D. Meranze and M. Gruenstein: Gastroenterology **5**, 43 (1941). — [15] Straub, W., u. P. Viaud: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **169**, 1 (1933). — [16] Wick, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 485 (1951).

Dr. R. Kadatz u. Dr. H. Klupp,
Pharmakol. Laboratorien der Firma Dr. Karl Thomae, Biberach an der Riß

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 393—399 (1956)

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. med. KURT WACHHOLDER)

Die Wirkung von coffeinhaltigem Kaffee auf die Flimmerverschmelzungsfrequenz

Von

WOLFGANG SCHNEIDER

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. Oktober 1955)

Im Zusammenhang mit der Frage, ob und wie weit die geistige und körperliche Leistungsfähigkeit an Hand der Messung, bis zu welcher Frequenz Lichtblitze eben noch getrennt wahrgenommen werden können, kurz an Hand der Messung der sogenannten Flimmerverschmelzungsfrequenz (FVF) festgestellt werden kann, lag es nahe, auch den Einfluß des Coffeins bzw. des Genusses von Kaffee zu untersuchen.

Zur Bestimmung der psychischen Ermüdung ging SCHMIDTKE[9] derart vor, daß er in einer ersten Versuchsreihe 25 Vpn Ersatzkaffee mit 100 mg Coffein und 0,5 g Zucker trinken ließ und dabei feststellte, daß nach 90 min die FVF um 1—2 Blitze angestiegen, während sie in Leerversuchen ohne Coffein fast ebensoviel abgesunken war. In einer zweiten Versuchsreihe wurden bei einer kleinen Zahl von Vpn in Abständen von 30 min Messungen gemacht. Während in diesen beiden Versuchsreihen die Vpn körperlich und geistig untätig waren, mußten sie in einer dritten Versuchsreihe 3 Std lang addieren. Hierbei ergab sich, daß unter Coffein die FVF weniger absank als im Leerversuch. Betont sei im Hinblick auf die folgenden eigenen Versuche, daß SCHMIDTKE auch in dieser dritten Versuchsreihe die erste Messung erst 30 min nach der Einnahme des Coffeins vornahm. MÜCHER u. WENDT[8] fanden ebenso wie SCHMIDTKE eine Steigerung der FVF auf Coffein. Aber auch von ihnen wurde nur ein Wert eine Stunde nach der Einnahme des Coffeins bestimmt.

WACHHOLDER u. Mitarb. aber zeigten, daß die Verhältnisse sowohl bei geistiger[14] als auch bei körperlicher Beanspruchung[12] nicht so einfach liegen. Vor allem ergab sich, als die Messungen wesentlich häufiger und besonders früher nach Beginn der Beanspruchung vorgenommen wurden, als dies SCHMIDTKE und alle anderen Untersucher auf diesem Gebiet getan hatten, daß die FVF-Kurve nicht einen einphasigen sondern einen mehrphasigen Verlauf zeigt. Außerdem hatte schon W. R. HESS darauf hingewiesen, daß die vegetative Beeinflussung der animalen Funktionen sich auch auf die Sinnesfunktion erstreckte (HESS u. LEHMANN[6]). WACHHOLDER u. ARNOLD[11] haben diesen Einfluß für die Leistungsfähigkeit des optischen Apparates beweisen können: sie fanden durch Bestimmung der FVF genau in dem nach HESS zu erwartenden Sinne, daß die Leistungsfähigkeit unseres Lichtsinnesapparates durch den Sympathicus gesteigert und durch den Parasympathicus gesenkt wird. Der Hauptwirkung gingen aber entgegengesetzte Reaktionen voraus, bzw. folgten ihr nach. Es ergab sich also auch hier eine Tendenz zum mehrphasigen Hin- und

Herreagieren, wie sie Wachholder u. Mitarb.[13] für andere vegetative Reaktionen, insbesondere solche des weißen Blutbildes, typisch fanden.

Auf Anregung von Prof. Wachholder untersuchte ich nun, ob ein solches mehrphasiges Verhalten der FVF auch auf die Einwirkung von Coffein zu finden ist. Veranlassung dafür bot einmal, daß oft schon subjektiv eine deutliche zweiphasige Wirkung nach Kaffeegenuß empfunden wird, indem die erfrischende und anregende Wirkung nicht gleich einsetzt, sondern ihr eine etwa viertelstündige Phase vorangeht, in der man sich mehr oder minder deutlich müde und unlustig fühlt[2, 3]. Zweitens gab Veranlassung, daß das Coffein ein vegetativer, im wesentlichen sympathisch wirkender Reizstoff ist. Wachholder u. Arnold[11] fanden nämlich, daß es auf Injektion der sympathischen Wirkstoffe — sowohl auf Adrenalin als auch Noradrenalin — in der Hauptphase zwar zu einer Erhöhung der FVF kommt, dieser bei Injektion einer kleinen Dosis jedoch eine Phase schwacher Senkung der FVF vorausgeht.

Methodik

Nachdem die Vp in dem stillen, mäßig erleuchteten Raum so lange ruhig gesessen hatte, daß etwaige Vorbeeinflussungen der FVF durch andere Beleuchtung, Arbeitsbeanspruchung usw. wahrscheinlich abgeklungen waren, wurden in Abständen von 5 min mehrere Ruhewertbestimmungen durchgeführt. Die Zahl dieser Bestimmungen richtete sich danach, ob bald ein sicheres Ausgangsniveau erreicht war oder dieses sich erst allmählich einstellte. Die Ruhewertschwankungsbreite war dann stets sehr klein, da die Vpn (Angehörige des Instituts und Studierende der Medizin) in der Angabe der Verschmelzungsfrequenz vorher eingeübt waren. Einzelne Vpn, welche trotz Übung nicht in der Lage waren, genügend konstante Angaben zu machen, wurden ausgemerzt. Erst wenn ein genügend konstantes Ausgangsniveau erreicht war (in den Untersuchungen von Schmidtke war das bei nur einer Ruhewertbestimmung nicht gesichert) wurde der Kaffee verabfolgt und in wenigen Minuten getrunken. Anschließend wurde wiederum in Abständen von 5 min die FVF gemessen, bis — mit Ausnahme der Leerversuche — nach ungefähr einer Stunde eine einwandfreie Steigerung der FVF eingetreten war.

Die Bestimmung der FVF erfolgte auf die gleiche Weise wie in den vorangegangenen Arbeiten von Wachholder u. Mitarb.[1, 11, 12, 14]. Es wurde darauf geachtet, daß die Versuchsperson aus dem Motorengeräusch keinen Hinweis auf die Frequenz gewinnen konnte. Vom Gebrauch künstlicher Pupillen konnte des geringen Sehwinkels wegen abgesehen werden.

Gleichzeitig mit der Bestimmung der FVF wurden Puls und Blutdruck gemessen, um etwaige Beeinflussungen durch Kreislaufveränderungen in Rechnung stellen zu können.

Verabfolgt wurden 200 cm^3 Kaffee aus 2—5 g Nescafe (normal und Typ Espresso) oder Bohnenkaffee. Zucker wurde nicht gegeben, da nach noch unveröffentlichten Untersuchungen aus unserem Institut die FVF durch Änderungen des Blutzuckerspiegels beeinflußt wird. Zur Kontrolle wurden Versuche mit coffeinfreiem Kaffee durchgeführt. Um einen Vergleich mit den Versuchen von Schmidtke sowie von Mücher u. Wendt zu ermöglichen, wurde auch die Reaktion auf reines Coffein ausprobiert, sie unterschied sich aber nicht wesentlich von derjenigen auf coffeinhaltigen Kaffee.

Ergebnisse

Es wurden in 45 Versuchen 22 Personen untersucht, deren Ruhewerte der FVF konstant genug waren, um auftretende Veränderungen einwandfrei beurteilen zu können. Dabei ergab sich unter entsprechenden Verhältnissen stets ein gleichartiges Verhalten der FVF, wenn man von der unterschiedlichen Stärke des Kaffees, die bei den einzelnen Vpn nötig war, um zu einer Reaktion zu führen, absieht.

Die günstigsten Voraussetzungen waren gegeben, wenn die zu untersuchende Vp bei Beginn des Versuches weder ermüdet, noch allzu erregt war, sondern sich in einer mehr oder weniger ausgeglichenen Ausgangslage befand. Unter diesen Bedingungen ergab sich stets auf einen genügend starken Kaffee hin ein typisch mehrphasiger Verlauf der FVF. In keinem der Versuche zeigte sich sofort der nach Schmidtke zu erwartende Anstieg der FVF, sondern dieser Hauptphase ging in allen Fällen, in denen der Kaffee überhaupt zu einer Reaktion führte, eine Phase der Senkung der FVF voraus. Nach etwa 15—20 min hatte die Verschmelzungsfrequenz ihr Ausgangsniveau wieder erreicht und begann jetzt zu steigen, um nach ungefähr einer Stunde ein Maximum zu erreichen. War der Gipfel überschritten, so wurden die Versuche abgebrochen.

Auffallend war in allen Versuchen eine gesteigerte Unsicherheit der Vpn bei der Angabe der FVF nach dem Trinken des Kaffees. Diese Unsicherheit war sowohl subjektiv aus den Aussagen der Vpn, als auch objektiv an einer vergrößerten Schwankungsbreite der FVF zu erkennen. Die größte Unsicherheit und stärkste Ungenauigkeit der Angaben fielen ungefähr mit dem Minimum der FVF-Kurve zusammen. Bei Wiederanstieg der FVF und zunehmender Anregung schwanden sie mehr und mehr.

Auch der subjektiv von der Vp beurteilte Anregungszustand zeigte keinen einfachen Verlauf im Sinne einer einfachen Steigerung, sondern ein Großteil der Vpn (die über die gesenkte Vorphase nicht unterrichtet worden waren und die auch eigentlich sofort nach dem Genuß des Kaffees eine Anregung erwarteten) gab an, sich kurze Zeit nach der Aufnahme des Getränkes eher etwas müder als vorher, jedoch nicht angeregt zu fühlen. Dieses Gefühl überdauerte die initiale Senkung der FVF deutlich, und die Vpn äußerten ein subjektives Anregungsgefühl im allgemeinen erst, nachdem die FVF das ursprüngliche Ausgangsniveau schon wieder erreicht und überschritten hatte. Doch waren nicht alle Vpn in der Lage, ihren subjektiven Zustand genügend genau zu beurteilen.

Von großer Bedeutung erwies sich die Stärke des Kaffees bzw. im Zusammenhang damit, ob die Vp gewohnt war, starken Kaffee zu trinken oder nicht und ob sie vegetativ erregbar war und demgemäß den

gereichten Kaffee als schwach oder stark empfand. Im allgemeinen war bei schwachem bzw. als schwach empfundenem Kaffee das initiale Absinken der FVF wesentlich stärker und vor allem längerdauernd als bei starkem, bzw. als stark empfundenem Kaffee. Auch ging nur bei letzterem die nachfolgende Steigerung der FVF innerhalb der untersuchten Zeit (50—60 min) einwandfrei über das Ausgangsniveau hinaus. Abb. 1 zeigt diesen Unterschied in der Wirkung verschieden starken Kaffees in 2 Versuchen bei derselben Versuchsperson.

Solche Vergleiche zweier Versuche, sei es an derselben oder an verschiedenen Vpn, sind aber nur dann möglich, wenn wie im Fall der Abb. 1

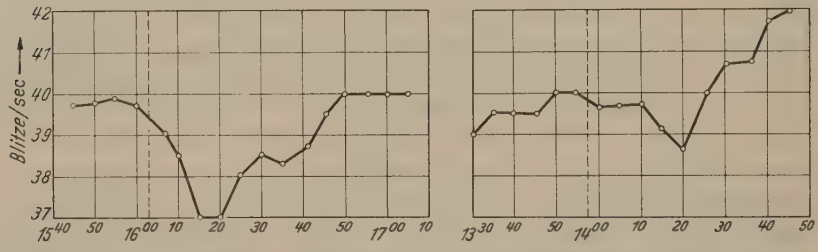


Abb. 1. Verschiedene Wirkung von schwachem coffeinhaltigem Kaffee (links) und von starkem (rechts) auf die FVF. Dieselbe Vp unter gleichen Vorbedingungen, daher gleiche Ausgangslage der FVF

die Ausgangswerte annähernd gleich sind. Um eine solche Ausgangsgleichheit zu erreichen, müssen die Versuche unter anderem vor allem zur etwa gleichen Tageszeit angestellt werden. Im Verlauf der Untersuchungen fiel uns auf, daß besonders in Nachmittagsversuchen die FVF-Kurve den typischen mehrphasigen Verlauf mit kürzerer initialer Senkung und nachfolgender längerer Steigerung zeigte, während die FVF sich bei frühmorgens untersuchten Personen entweder nicht deutlich änderte oder aber nur eine ausgeprägte Senkung mit Wiederanstieg bis zum Ausgangsniveau zeigte. Dabei waren alle sonstigen Versuchsbedingungen, insbesondere auch die Stärke des Kaffees, die gleichen. In solchen Morgenversuchen erklärten die Versuchspersonen zu Beginn, sie seien noch sehr müde, während sie sich nachmittags frischer fühlten. Dem verschiedenen Müdigkeitszustand entsprechend lag, was zu erwarten war, das FVF-Ausgangsniveau morgens tiefer als nachmittags. Abb. 2 zeigt das an einem Beispiel: Morgens in nicht ausgeschlafenem, noch ermüdetem Zustand bewirkt der Kaffee aus tieferem Ausgangsniveau der FVF heraus nur eine ausgeprägte, langanhaltende Senkung derselben, ohne aber danach das Ausgangsniveau zu übersteigen. Nachmittags dagegen führt bei höherem Ausgangsniveau die ungefähr gleiche Menge Kaffee zu einer wesentlich kürzeren Senkung mit sehr starker darauffolgender Steigerung der FVF weit über das erhöhte Ausgangsniveau hinaus. Der Unterschied ließ sich experimentell reproduzieren. Wir ließen

dazu eine Vp mehrmals im Versuchsraum übernachten und stellten den Versuch gleich nach dem Erwachen an, als die Schlaftrunkenheit noch nicht überwunden war. Das Ergebnis war stets, auch auf starken Kaffee hin, eine ausgeprägte Senkung der FVF mit Wiederanstieg nur bis zur Ausgangslage, während diese Vp zu anderen Tageszeiten sehr typisch mit starker Erhöhung der FVF nach nur kurzer initialer Senkung reagierte.

Um sicherzustellen, daß die geschilderten Reaktionen der FVF tatsächlich dem Coffein zuzuschreiben sind und nicht auf Flüssigkeits-, Wärmezufuhr usw. beruhen, wurden Kontrollversuche mit coffein-

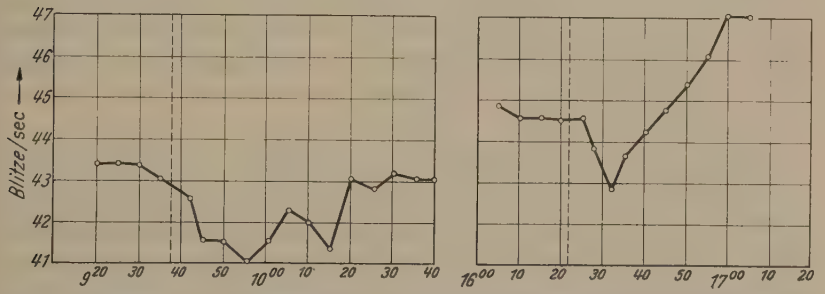


Abb. 2. Verschieden hohe Ausgangslage der FVF und verschiedene Reaktion auf gleichstarken coffeinhaltigen Kaffee in noch müdem Zustand (links) und in nicht müdem (rechts)

freiem Bohnenkaffee und coffeinfreiem Nescafe durchgeführt. Hier ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der FVF. Ebenso konnte ausgeschlossen werden, daß die Veränderungen der FVF der Wirkung von Röstprodukten zuzuschreiben sind, denn sowohl die initiale Senkung als auch die nachfolgende Steigerung der FVF wurden gleichermaßen erhalten bei den ganz unterschiedliche Mengen von Röstprodukten enthaltenden verschiedenen Kaffeearten als vor allem auch bei Einnahme von reinem Coffein.

Um zu prüfen, ob die Wirkungen des Coffeins auf die FVF als direkte auf den optischen Apparat (Auge und Zentralnervensystem) anzusehen waren oder als indirekt über Änderungen des Kreislaufs ausgelöste, wurden gleichzeitig Blutdruck und Pulsfrequenz verfolgt. Soweit diese aber überhaupt als signifikant anzusehende Veränderungen erfuhren, gingen deren Schwankungen diejenigen der FVF in keinem Falle parallel. Auch wurde in 2 Versuchen an derselben Vp bei gleichem FVF-Kurvenverlauf einmal eine Steigerung und einmal eine Senkung von Blutdruck und Puls beobachtet. Auf die Wiedergabe von Kurven kann verzichtet werden, da die gleiche Unabhängigkeit des Verhaltens der FVF von Durchblutungsänderungen von Wachholder u. Arnold[11] schon für Adrenalin und andere vegetative Wirkstoffe belegt worden ist.

Besprechung der Ergebnisse

Gleichzeitig mit der primären Senkung der FVF wurde von der Mehrzahl der Untersuchten angegeben, daß sie auf den Kaffeegenuß nicht sogleich angeregt und frischer gewesen seien, sondern zunächst eine Zeitlang eher müder. Wenn dies nicht immer angegeben wurde, oder wenn die Schwankungen der subjektiven Müdigkeitsbeurteilung mit den Schwankungen der FVF zeitlich nicht immer übereinstimmten, so liegt das einmal an der Unsicherheit aller solcher subjektiver Beurteilungen, sicher aber nicht allein daran. Vielmehr zeigt sich hier, was Wachholder u. Mitarb. sowohl bei körperlicher als auch bei geistiger Beanspruchung immer wieder festgestellt haben, daß — entgegen einer häufig vertretenen Ansicht — die Höhe der FVF kein einwandfreies Kriterium für den Ermüdungszustand eines Menschen darstellt. Dazu ist die Höhe der FVF von zuviel anderen Faktoren abhängig.

Einer dieser Faktoren ist nach Wachholder u. Arnold das vegetative Nervensystem. Das findet in den vorliegenden Untersuchungen insofern eine Bestätigung, als auf Coffein entsprechend seinem Charakter als vorwiegend sympathisch wirkendem Reizstoff genau dieselbe FVF-Beeinflussung gefunden wurde wie von Wachholder u. Arnold auf kleinere Dosen von Adrenalin oder Noradrenalin, nämlich initiale Senkung mit nachfolgender Steigerung und bei ganz kleinen Dosen nur längerdauernde Senkung.

Auf die Parallele der initialen Senkung der FVF zu dem von Siedek u. Häusler bei anderen Reaktionen beschriebenen trophotropen Vorschlag vor ergotropen Wirkungen haben bereits Wachholder u. Arnold hingewiesen. Auch diese Parallele findet in den vorliegenden Untersuchungen eine Bestätigung.

Siedek, Häusler und Zach[4, 5, 7, 10, 15] haben nämlich bei vegetativen Dystonikern eine Abwandlung ihres „Dreitaktschemas" beschrieben. Nach diesen Autoren findet sich bei vorherrschendem Parasympathicotonus eine Betonung der trophotropen (negativen) Phasen, während Sympathicotoniker nur eine kurze und schnelle negative Vorphase gefolgt von einer ausgeprägt positiven Hauptphase aufweisen sollen. Das ist aber genau der gleiche Unterschied wie wir ihn in der Wirkung des Coffeins auf die FVF einerseits morgens unter Schlafnachwirkung, also in noch zum Parasympathischen hin verschobener vegetativer Regulationslage gefunden haben und andererseits nachmittags in angeregterem Zustand, bzw. mehr zum Sympathischen hin verschobener Lage. Was Siedek, Häusler und Zach als pathologische Abweichungen beschrieben haben, hat sich also bei unseren Untersuchungen als tageszeitliche, noch physiologische Schwankungen wiedergefunden.

Es sei abschließend noch darauf hingewiesen, daß diese Reaktionsunterschiede nicht zum sogenannten Wilderschen Ausgangswertgesetz passen.

Zusammenfassung

Nach Trinken von coffeinhaltigem Kaffee (nicht von coffeinfreiem) kommt es initial zu einer Senkung der Flimmerverschmelzungsfrequenz (FVF), der bei genügend starkem Kaffee nach 20—30 min eine Steigerung nachfolgt. Dem entspricht, daß subjektiv dem Angeregtwerden eine Spanne mehr oder weniger ausgesprochener verstärkter Müdigkeit vorangeht.

In nicht ausgeschlafenem bzw. ermüdetem Zustand kommt es trotz tieferem Ausgangsniveau der FVF zu einer weiteren starken und langanhaltenden Senkung derselben, während in angeregtem Zustand auf die gleiche Menge Kaffee die FVF bei höherem Ausgangsniveau nur eine kurze schwächere Senkung mit nachfolgender starker Steigerung erfährt.

Literatur

[1] Busch: Psychol. Beiträge **1**, 312 (1953). — [2] Eichholtz: Lehrb. d. Pharmakol. 1948, s. S. 299. — [3] Eichler: Kaffee und Coffein 1938, S. 25. — [4] Häusler: Schweiz. Med. Wschr. **1952**, 528. — [5] Häusler u. Siedek: Cardiologia (Basel) **18** 233 (1951). — [6] Hess u. Lehmann: Pflügers Arch. **211**, 603 (1926). — [7] Mlcoch u. Siedek: Wien. Z. inn. Med. **29**, 125 (1948). — [8] Mücher u. Wendt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 29 (1951). — [9] Schmidtke: Psychol. Forsch. **23**, 454 (1951). — [10] Siedek: Wien. klin. Wschr. **1951**, 687. — [11] Wachholder u. Arnold: Schweiz. med. Wschr. **1953**, 1503; Z. Biol. **107**, 252 (1954). — [12] Wachholder u. Arnold: Arbeitsphysiologie **15**, 139 (1953). — [13] Wachholder u. Beckmann: Klin. Wschr. **1952**, 1030. — [14] Wachholder u. Busch: Arbeitsphysiologie **15**, 149 (1953). — [15] Zach: Wien. med. Wschr. **1952**, 52, 73.

W. Schneider, Bonn, Physiol. Institut d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 400—408 (1956)

Aus der Medizinischen Fakultät der Medizinischen Hochschule
„Wylko Tscherwenkov", Sofia
Lehrstuhl für Physiologie (Leiter: Prof. Dr. D. P. Orahovats) und
Lehrstuhl für Therapie der Innenkrankheiten (Leiter: Prof. Dr. Al. Puchlev)

Die Kreislaufwirkung der isotonischen und hypertonischen Lösungen

I. Mitteilung

Die Wirkung von Magnesiumsulfat auf die Blutgefäße der unteren Extremitäten beim Menschen

Von
T. Gotsev und L. Atanassowa

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen 7. Oktober 1955)

Bekanntlich wird Magnesiumsulfat bei der Behandlung einiger Erkrankungen, wie Tetanus, Chorea, paroxysmale Tachykardie, akute Strychninvergiftung sowie als Blockierungs- und Infiltrationsmittel an Stelle von Novokainlösung erfolgreich verwendet. Mjassnikov hebt hervor, daß das Magnesiumsulfat schon lange bei der Behandlung von Hypertension benutzt wird. In letzter Zeit wenden Perlja sowie auch Afanassiewa diese Behandlung bei Hypertension an.

Während es diesbezüglich zahlreiche Forschungen an Tieren gibt, darunter auch diejenigen von uns (Gotsev), liegen verhältnismäßig wenige Untersuchungen an Menschen vor.

Calderone hat Patienten mit Hypertension 5—10 cm³ 50%ige Magnesiumsulfatlösung injiziert und Senkung des Blutdruckes festgestellt. Haury hat 7 Patienten mit vasomotorischen Störungen je 20 cm³ 10%ige Magnesiumsulfatlösung und zwar je 4 cm³ pro Minute in die V. mediana cubiti eingespritzt. Mit Hilfe des Plethysmographen hat er eine beträchtliche Volumenzunahme der oberen und unteren Extremitäten festgestellt, welche 10 bis 30 min andauerte. Er nimmt an, daß es sich hier um eine aktive Blutgefäßerweiterung handelt. Hoff, Smith und Winkler haben bei Versuchen an Hunden und Katzen isotonische Lösungen von Magnesiumsulfat langsam in die V. femoralis injiziert, bis bei dem betreffenden Tier der Tod eintrat und haben schnellen und progressiven Abfall des Blutdrucks beobachtet. Dabei haben sie festgestellt, daß das Magnesiumsulfat deutlich ausgeprägte gefäßerweiternde Wirkung ausübt. Werle und Semm haben Versuche an Hunde angestellt, die mit Morphin-Pernokton narkotisiert waren, und haben an Hand der Thermostromuhr von Rein festgestellt, daß bei intravenöser Verabfolgung von Magnesiumthiosulfat Erhöhung der Blutfülle in der Peripherie bei gleichzeitigem Abfall des Blutdrucks eintritt. Dies spricht für Erweiterung der Blutgefäße, was der Autor der Wirkung der Magnesiumionen zuschreibt.

Im Hinblick auf die verhältnismäßig wenigen Untersuchungen an Menschen wurde von uns die Wirkung des Magnesiumsulfats in klinisch angewandter Dosierung auf die Blutgefäße der unteren Extremitäten bei Patienten mit Hypertension und bei Gesunden ermittelt.

Technik

Die Veränderungen in den Blutgefäßen der unteren Extremität untersuchten wir mit Hilfe eines metallischen Plethysmographen in Form eines Schaftstiefels, der bis zum oberen Drittel der Wade reichte. Über die Öffnung des Plethysmographen wurde vorher ein Stück dicken Autopneus gebunden, in dessen Mitte eine runde Öffnung gemacht war, durch die der Fuß hindurchgehen kann und die eng genug ist, die weichen Gewebe der Wade dicht zu umschließen. Am oberen Ende des Apparates befinden sich in seinem metallischen Teil zwei nebeneinander gelegene Öffnungen von etwa 4 mm Durchmesser, die mit je einem ungefähr 5 cm langen Metallröhrchen verbunden sind. Das eine davon wird mit einem Gummischlauch, an dessen Ende sich ein Trichter befindet, das andere vermittels eines Gummischlauchs mit einer Marey-Kapsel verbunden, dessen Schreibspitze das berußte Papier eines Kymographen berührt.

Die Person, an der die Untersuchung vorgenommen werden soll, liegt, unter dem Kopf ein Kissen, bequem auf einem gewöhnlichen Bett. Es wird ein Plethysmograph ausgewählt, dessen Öffnung in dem Pneu dem Wadenumfang der betreffenden Person entspricht. Das eine Bein wird so hineingesteckt, daß der Fuß bis zur Sohle des metallischen Schaftstiefels kommt und die Pneuöffnung die weichen Gewebe gut umschließt. Hiernach wird das Bein leicht im Kniegelenk gebogen, wobei ein Kissen unter den Oberschenkel geschoben wird, um ihn zu fixieren. Das andere Bein verharrt in horizontaler Lage. Nun gießt man durch den Trichter auf 32° erwärmtes Wasser. Bei Eingießen des Wassers entweicht die Luft durch die andere Öffnung. Durch energisches Bewegen der Zehen verteilt sich das Wasser um den ganzen Fuß herum. Beim Füllen des Plethsymographen mit Wasser muß darauf geachtet werden, daß im höchsten Teil des Apparates, d. h. um die beiden Öffnungen herum, etwas Luft bleibt. Die Öffnung des freien Metallröhrchens wird mit der Marey-Kapsel verbunden, und der Gummischlauch mit dem Trichter wird mit einer Metallklemme zugeklammert. Bei richtiger Anordnung der Apparatur läuft kein Wasser aus dem Plethysmographen und wird keine venöse Stauung beobachtet. In diesem Fall werden die Schwankungen in den arteriellen Gefäßen deutlich ablesbar wiedergegeben und auf dem sich langsam bewegenden Band des Kymographen registriert. Damit die untersuchte Person selbst die Registrierung nicht beobachten und beeinflussen kann, befestigt man ein Stück Papier oder Karton vor der Trommel.

Die Untersuchungen wurden nur an solchen Personen vorgenommen, bei denen vorher ein Plethysmogramm ohne wesentliche Schwankungen registriert wurde, bei denen also ein beständiges Niveau der Kurve erhalten worden war. Hiernach wird das Ausgangsniveau vermerkt und die Lösung eingespritzt. Gewöhnlich erhält man Plethysmogramm-0 nach mehrfachen vorhergehenden Registrierungen ohne Einspritzen von Lösung. In manchen Fällen gelingt dies schon bei der ersten Untersuchung. Bei uns kam ein Fall vor, wo bei dreimaliger, jeden zweiten Tag vorgenommener Untersuchung schnelle und erhebliche Schwankungen in der Kurve beobachtet wurden. Die Bewegungen der Schreibspitze reichten vom einen Rand des Kymographenbandes bis zum anderen, und die Veränderungen erfolgten sehr schnell, trotzdem der Patient selbst vollkommen ruhig schien und keinerlei Muskelbewegungen aufwies. In solchen Fällen ist die Untersuchung unmöglich.

Jaroschewsky erhielt bei 24 von 36 gesunden Personen sowie bei 31 von 45 Hypertonikern im neurogenen Stadium schon bei der ersten Untersuchung Plethysmogramm-O. Bei 14 Hypertonikern hat er jähe Schwankungen der Kurve beobachtet, wie er sie bei gesunden nicht festgestellt hat.

Sawtschuk hat Plethysmogramm-O bei Gesunden nach der 3. bis 7. Untersuchung erhalten und bei Hypertonikern nach der 30. bis 40. Untersuchung.

Nach der Registrierung des Ausgangsniveaus schreitet man zu Verabfolgung der Lösung. Die Vorbereitung zum Einspritzen, das Gewahrwerden der Spritze, das Abschnüren des Armes, sowie auch das Einstechen selbst wirken sich in der Regel in vorübergehender Abnahme des Volumens der Extremität aus. Aus diesem Grunde wartet man nach dem Einführen der Nadel in die Vene die Wiederherstellung des Ausgangsniveaus der Kurve ab und injiziert dann erst die Lösung. Die bis zur Wiederherstellung des Ausgangsniveaus verlaufende Zeit ist bei den verschiedenen Individuen verschieden. Gewöhnlich beträgt sie 2 bis 3 min (Abb. 1).

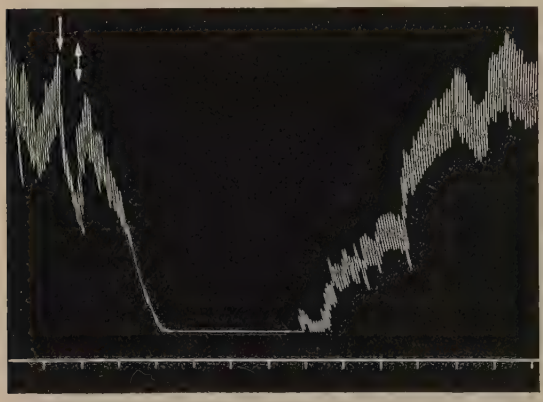


Abb. 1. 25. August 1954. Sch. B. Morbus hypertonicus. Bei ↓ bemerkt der Patient die Spritze. Bei ↑↓ Einstechen der Nadel in die V. mediana cubiti. Zeit: jeder Strich = 10 sec

Das Registrieren des Plethysmogramms der unteren Extremität hat sich als bequem und leicht ausführbar erwiesen. Der Untersuchte liegt bequem und kann die Skeletmuskeln lockern. Bei Liegenden kann man intravenöse Einspritzungen leicht vornehmen. Außerdem kann die Registrierung auch an Kranken, die nicht aufrecht sitzen können, vorgenommen werden, sowie auch während des Schlafes usw.

Zur Anwendung kamen isotonische (1,8%) und hypertonische (10% und 25%), stets frisch bereitete Magnesiumsulfatlösungen in Dosen von 2—10 cm³. Die Injektion erfolgte in die V. mediana cubiti mit der in der Praxis gebräuchlichen Zeitspanne — 10 cm³ innerhalb etwa 1 min. In einigen Fällen nahmen wir Kontrolluntersuchungen mit schneller Injektion — innerhalb 15 sec — und andere mit langsamer Injektion — 60 sec vor. Es wurde nur einmal am Tage injiziert. In einzelnen Fällen wurde die Dosis 10 cm³ zweimalig zu je 5 cm³ in Zeitabstand von 2—3 min eingespritzt, während welcher Zeit die Nadel nicht aus der Vene gezogen wurde. Die isotonische Lösung wurde in einer Menge bis zu 25 cm³ verabfolgt.

In einigen Fällen wurden der Blutdruck und der Puls unmittelbar vor und nach der Einspritzung untersucht. In anderen Fällen wurde das Elektrokardiogramm unmittelbar vor und 1—5 min nach der Einspritzung der Lösung gemacht.

Die Untersuchungen wurden innerhalb der Zeitspanne vom 1. August 1954 bis zum 26. Juli 1955 bei gewöhnlicher Zimmertemperatur vorgenommen. Die Untersuchung dauert in der Regel nicht länger als 20 min, während welcher Zeit die Temperatur des Wassers im Plethysmographen nur unbeträchtlich sinkt.

Es wurden 13 Hypertoniker der Untersuchung unterzogen, von denen 12 bettlägerig waren und einer sich in der Nervenklinik befand sowie auch 6 Gesunde.

Ergebnisse

Nach der Einspritzung von isotonischer Magnesiumsulfatlösung erfolgt meistens Erweiterung der Blutgefäße, seltener Zusammensiehung, gefolgt von Erweiterung derselben.

Nach der Injektion hypertonischer Magnesiumsulfatlösung werden meistens Zweiphasenveränderungen der Blutgefäße der unteren Extremität beobachtet, die in vorübergehender Zusammenziehung und darauf folgender Erweiterung zum Ausdruck kommen. Die Erweiterung

Abb. 2. 28. August 1954. N. G., Morbus hypertonicus. Bei ↓ wurden 10 cm³ 10%ige Magnesiumsulfatlösung innerhalb 15 sec in die V. mediana cubiti injiziert. Zeit in Sekunden

dauert länger an als die Zusammenziehung; in manchen Fällen hält sie mehr als 15 min an (Abb. 2). In den meisten Fällen wird nur Erweiterung beobachtet, sehr selten nur Zusammenziehung der Blutgefäße.

Insgesamt haben wir 77 Einspritzungen von Magnesiumsulfat an Gesunden und Kranken vorgenommen. Hiervon wurden in 34 Fällen Zweiphasenreaktion der Blutgefäße, in 23 Fällen Erweiterung, in 14 Fällen Zusammenziehung und in 6 Fällen nur unbeträchtliche Veränderungen festgestellt.

In einigen Fällen kommt die Zusammenziehung schwach zum Ausdruck, während sie in anderen stark und anhaltend ist. In manchen Fällen dauert sie 4 min. Die Erweiterung kommt gewöhnlich stärker zum Ausdruck und hält längere Zeit an. Manchmal dauert sie länger als 15 min.

Bei schnellem Injizieren der hypertonischen Lösung — 15 sec lang — wird meistens stark ausgeprägte Zusammenziehung der Blutgefäße beobachtet (Abb. 3), während bei langsamem Einspritzen der-

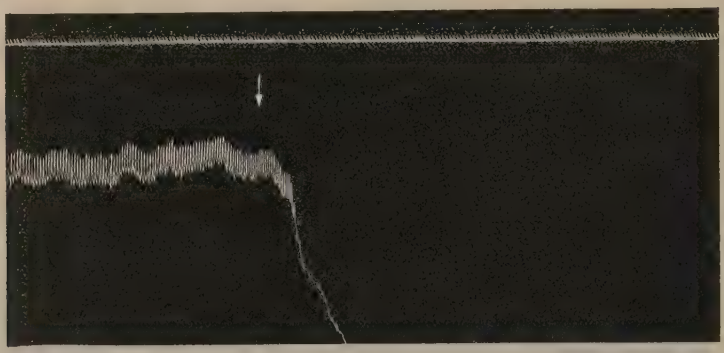


Abb. 3. 6. August 1954. Ingenieur D., Morbus hypertonicus. Bei ↓ wurden 10 cm³ 10%ige Magnesiumsulfatlösung innerhalb 10 sec in die V. mediana cubiti injiziert. Zeit in Sekunden

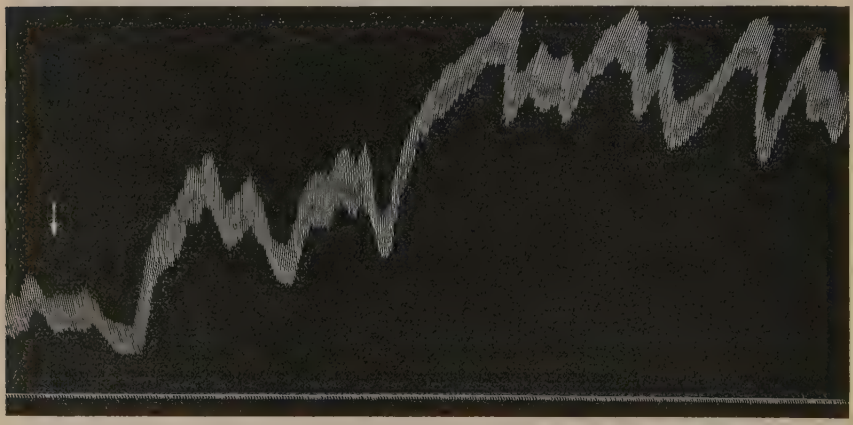


Abb. 4. 30. Juli 1954. G. N., gesund. Bei ↓ wurden 10 cm³ 10%ige Magnesiumsulfatlösung innerhalb 70 sec in die V. mediana cubiti injiziert. Zeit in Sekunden

selben Menge der Lösung meistens Erweiterung der Blutgefäße eintritt (Abb. 4).

Die isotonische Lösung verursacht, langsam injiziert, nur unbedeutende Veränderungen der Blutgefäße; schnell eingespritzt zeitigt sie in den meisten Fällen Erweiterung oder Zweiphasenveränderung sogar auch in den Fällen, in denen die Lösung in einer Menge bis zu 25 cm³ zugeführt wird.

In der von uns verwendeten Dosierung hat das Magnesiumsulfat in den meisten Fällen leichte Blutdrucksenkung hervorgerufen. Bei Hypertonikern fällt der systolische Blutdruck um 10—15 mm Hg. Dieser

Blutdruckabfall ist von kurzer Dauer, er hält ungefähr 5—6 min an. Es gibt Fälle, in denen Veränderungen im Blutdruckniveau nicht beobachtet werden. In einem Fall fiel der Blutdruck von RR 225/140 auf RR 195/135 mm Hg ab, und zwar für die gleiche Zeit, während der die Blutgefäße der unteren Extremität stark zusammengezogen waren. 10 min nach dem Einspritzen der Lösung erlangt der Blutdruck wieder das ursprüngliche Niveau.

Einer der untersuchten Patienten hatte eine Hemiplegia dextra, wobei aktive Bewegungen der rechten unteren Extremität unmöglich

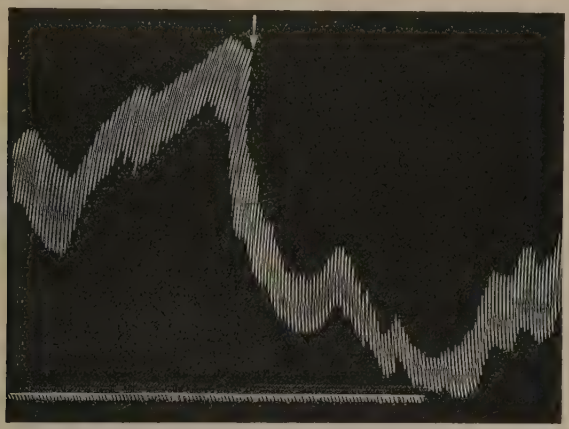


Abb. 5. 24. Juli 1954. M. B., Morbus hypertonicus. Pletysmogramm während gewöhnlichen Schlafes. Bei ↓ Patient erwacht. Zeit in Sekunden

waren. Bei diesem Kranken wurden typische rhythmische Schwankungen beobachtet, die für das Plethysmogramm der unteren Extremität charakteristisch sind. In einem anderen Fall wurde das Plethysmogramm während normalen Schlafes registriert. Auch hier bemerkte man dieselben Schwankungen. Im Moment des Wachwerdens trat schwach ausgeprägte und schnell vorübergehende Zusammenziehung der Blutgefäße ein (Abb. 5).

Das Injizieren von Magnesiumsulfat bewirkt Beschleunigung der Herztätigkeit je nach der Dosis und der Schnelligkeit des Einspritzens. Gewöhnlich wird der Puls um 8—16 Schläge in der Minute beschleunigt, und zwar treten die Veränderungen 1—2 min nach dem Beginn der Einspritzung auf. Der Pulsschlag wird 1—2 min nach vollendeter Injektion wieder normal.

An 12 Personen wurden Elektrokardiogramme gemacht. Fünf von ihnen wurden 10 cm^3 25%ige Magnesiumsulfatlösung eingespritzt, und 7 wurden mit 10 cm^3 10%iger Lösung injiziert. An ein und derselben Person wurden nacheinander einige Elektrokardiogramme gemacht,

und zwar vor der Einspritzung, 10—15 sec nach Beginn und 3—5 min nach Beendigung derselben. Bei einem Fall, in dem 25%ige Lösung verabfolgt wurde, gab es Merkmale für vorübergehende Störungen im Myocardium. Es handelt sich um die Hypertoniekranke M. D., 44 J., die vor der Einspritzung ein normales Elektrokardiogramm abgibt. Unmittelbar nach der Einspritzung zeigt das Elektrokardiogramm Durchblutungsstörungen im Myokard ($ST_{2,3}$ unter der isoelektrischen Linie, niedriges T_2, diphasisches T_3). 5 min nach der Einspritzung tritt eine allmähliche Wiederherstellung der Myokarddurchblutung ein, so daß am Ende wieder das Ausgangs-EKG. erreicht wird. In den übrigen Fällen wurden keine Veränderungen konstatiert.

Besprechung der Ergebnisse

Aus dem bisher Dargelegten ist ersichtlich, daß die intravenöse Verabfolgung von Magnesiumsulfat in isotonischer (1,8%) und hypertonischer (10% und 25%) Lösung verschiedene Veränderungen der Blutgefäße der unteren Extremitäten hervorruft, die meistens in vorübergehender Zusammenziehung und darauf folgender Erweiterung, seltener nur Erweiterung und noch seltener nur Zusammenziehung zum Ausdruck kommen.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen stimmen mit den von der oben erwähnten Autoren erhaltenen nicht völlig überein; diese beschreiben als einzige Reaktion beim Menschen Erweiterung der Blutgefäße.

In einer Reihe von Fällen beobachteten wir ein gewisses Abhängigkeitsverhältnis zwischen der Schnelligkeit des Einspritzens und der Veränderung in den Blutgefäßen. Bei schnellem Verabfolgen der Lösung — innerhalb 15 sec — erfolgte meistens Zusammenziehung der Blutgefäße, bei langsamem hingegen Erweiterung. Bei unseren Untersuchungen konnten wir uns nicht entschließen, auch nur in einem einzigen Fall eine größere Dosis zu verwenden oder die Einspritzung schneller vorzunehmen, wenngleich uns dies wertvolle Fingerzeige gegeben hätte. Angesichts der Resultate an Tieren wandten wir Magnesiumsulfat nur mit größter Vorsicht an.

Die Ursache für die in den meisten Fällen unmittelbar nach Einspritzung der Lösung beobachteten Gefäßverengung bleibt zur Zeit für uns unerklärlich. Es ist möglich, daß diese Verengung in Verbindung mit den Änderungen der Herzleistung reflektorisch bedingt ist. Die von uns in dem obengenannten Falle festgestellten EKG.-Veränderungen sprechen in diesem Sinne.

Die Erweiterung der Blutgefäße, die sofort nach dem Einspritzen beobachtet wird, sowie diejenige, die auf die vorübergehende Zusammenziehung folgt, könnte in der spezifischen Wirkung des Magnesiumions

auf die Blutgefäße ihre Erklärung finden. Bei seinen Tierexperimenten hat einer von uns (Gotsev) regelmäßig Erweiterung der Blutgefäße bei intraarterieller Einspritzung von Magnesiumsulfat beobachtet. In den Fällen, in denen die Herztätigkeit herabgesetzt ist, kann diese Wirkung nicht zum Ausdruck kommen. Die erfolgte Kreislaufverringerung in der Extremität hyperkompensiert die gefäßerweiternde Wirkung des Magnesiumsulfats, und sie kann nicht in Erscheinung treten.

Eine interessante Frage wirft Petrow in seiner Arbeit auf: er findet, daß die Harnabsonderung bei Patienten, denen intravenös Glykose zugeführt wurde, abnimmt, wenn die Glykose sehr schnell (mehr als 20 cm³ in der Minute) verabfolgt wird, sich jedoch nicht verändert, wenn das Einspritzen langsam vor sich geht. Die Verminderung der Harnmenge schreibt der Verfasser einem Krampf in den Nierengefäßen zu, der auf reflektorischem Wege im Zusammenhang mit Reizung der Gefäßrezeptoren durch die einverleibte Flüssigkeit entstanden ist. Auch bei unseren Versuchen beobachten wir schnelle und langdauernde Volumenverringerung der Extremität hauptsächlich bei schnellem Injizieren der Lösung (10 cm³ innerhalb 15 sec). Es drängt sich die Frage auf, ob es sich nicht auch hier um einen Gefäßkrampf infolge brutaler Verabfolgung der Flüssigkeit handelt.

Welchen Einfluß die Großhirnrinde auf die Wirkungsart des Magnesiumsulfats ausübt, ist eine Frage von höchster Bedeutung. Bekanntlich beeinflussen die Impulse der Interorezeptoren, die bis zu den höchsten Gebieten des Zentralnervensystems reichen, den Zustand der Arterien in bedeutendem Maße und können ziemlich jähe und schnelle Gefäßreaktionen hervorrufen. Nach Markuse spricht die Beharrlichkeit dieser Reaktionen bei der Hypertension für das Vorhandensein eines beständigen Erregungsherdes im Gebiete der Großhirnrinde. Zur Ermittlung des Einflusses der Großhirnrinde bei unseren Untersuchungen müssen daher weitere Erforschungen während des Luminalschlafes angestellt werden.

Aller Wahrscheinlichkeit nach ist auch der Typus höherer Nerventätigkeit von Bedeutung. Bekanntlich ist aber die Festsetzung des Typus höherer Nerventätigkeit mit großen Schwierigkeiten verbunden, und vorläufig können wir keine diesbezüglichen Forschungen unternehmen.

Was die heilende Wirkung des Magnesiumsulfats betrifft, so erlauben uns unsere Beobachtungen zu vermerken, daß vermittels langsamen und vorsichtigen Einspritzens 2—10%iger Magnesiumsulfatlösung der Widerstand im Blutzirkulationssystem während Anfällen von Angiospasmus bei Hypertension herabgesetzt werden kann. Die Behandlung der Hypertension mit Magnesiumsulfat bewirkt nur in seltenen Fällen Besserung, und auch dort, wo diese beobachtet wird, ist die Wirkung von kurzer Dauer.

Zusammenfassung

An 13 Hypertonikern und 6 gesunden Personen wurden die Veränderungen im funktionellen Zustand der Blutgefäße der unteren Extremitäten nach Einspritzung von isotonischer (1,8%) Magnesiumsulfatlösung in Dosen zu 5—25 cm³ und hypertonischer (10% und 25%) Magnesiumsulfatlösung in Dosen von 2—10 cm³ untersucht.

Bei schnellem Einspritzen trat meistens Volumenverringerung der Extremität ein, während bei langsamem Einspritzen Vergrößerung oder

Zweiphasenveränderung erfolgte, die als Volumenverringerung und darauf folgende Volumenvergrößerung der Extremität in Erscheinung trat. Die isotonische Lösung verursacht entweder Volumenvergrößerung der Extremität oder Zweiphasenveränderung — Verringerung und darauf folgende Vergrößerung.

Bei der intravenösen Verabfolgung des Magnesiumsulfats muß man größte Vorsicht walten lassen.

Literatur

Afanassiewa: zit. nach Mjassnikow. — Calderone, M.: Arch. Farmacol. sper. **61**, 60 (1936). — Gotsev, T.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **201**, 322 (1943). — Haury, V. G.: J. Labor. a. Clin. Med. **24**, 951 (1939). — Hoff, H. E., P. K. Smith and A. W. Winkler: Amer. J. Physiol. **127**, 722 (1939). — Jaroschewsky: Klin. Med. (Moskau) H. 9, 33 (1951). — Markuse, S. M.: Ter. Arch. H. 4, 47 (1954) (Russisch). — Mjassnikow, A. L.: Hypertonische Krankheit, Medgiz 321 (1954) (Russisch). — Perlja, A. N.: Klin. Med. (Moskau) H. 6, 92 (1950). — Petrow, A. L.: Vestn. Chir. H. 3, 21 (1951) (Russisch). — Sawtschuk, W.: Klin. Med. (Moskau) H. 9, 35 (1950). — Werle, E., u. K. Semm: Arzneimittel-Forsch. **2**, 307—309 (1952).

Prof. Dr. T. Gotsev,
Physiolog. Institut d. Medizin. Fakultät, Sofia/Bulgarien

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 409—413 (1956)

Aus dem Bundesgesundheitsamt, Max von Pettenkofer-Institut, Abt. für Physiologie und Pharmakologie, Berlin-Dahlem

Zur Frage der erhöhten Acetylcholinbildung im Gehirn nach langdauernder Glutaminsäurefütterung

Von
Claus Klotzsche

(Eingegangen am 16. September 1955)

In vorhergehenden Untersuchungen gelang es, mit Hilfe des Bradykardietestes und durch vergleichende toxikologische Prüfung eines Cholinesterase-Inhibitors (Diäthyl-p-nitrophenylphosphat) eine gesteigerte Acetylcholinbildung im Gehirn nach langdauernder l(+)-Glutaminsäurefütterung an weißen Mäusen wahrscheinlich zu machen (Klotzsche). Über die bei der Fortführung dieser Untersuchungen erzielten Ergebnisse soll im folgenden berichtet werden.

1. Der Glutaminsäure/Glutamingehalt im Gehirn nach Glutaminsäurefütterung

Zunächst war im Gehirn nach langdauernder Glutaminsäurefütterung ein erhöhter Glutaminsäure/Glutamingehalt anzunehmen.

Wir prüften daher, in welchem Maße Glutaminsäure bzw. Glutamin im Gehirn und in einigen anderen Organen nach 6wöchiger Verfütterung der bei unseren früheren Versuchen gewählten Dosis von 1,25 g l(+)-Glutaminsäure pro Kilogramm Körpergewicht ansteigt. Untersucht wurden Gehirn, Niere und Leber von weißen Ratten, sowie Gehirn und Leber von weißen Mäusen.

Um mittlere Werte zu erhalten, wurden jeweils die entsprechenden Organe von 5 Tieren zusammen hydrolysiert. Die Bestimmung von Glutaminsäure + Glutamin erfolgte mikrobiologisch nach Hac, Snell und Williams mit Lactobacillus arabinosus 17/5 als Testkeim. Nach dreitägiger Bebrütung bei 37° C wurde die gebildete Milchsäure mit n/10 Natronlauge gegen Bromthymolblau titriert.

Im Gehirn der normalen Ratte fanden wir einen durchschnittlichen Wert von 180 mg-% Glutaminsäure/Glutamin, in der Niere 105 mg-% und in der Leber 95 mg-%. Haber und Saidel hatten 1948 ebenfalls mikrobiologisch einen etwas höheren Wert (220 mg-%) für Glutaminsäure/Glutamin im Gehirn gefunden.

Nach sechswöchiger Glutaminsäurefütterung war der Gehalt bei unseren Ratten stark erhöht, im Gehirn auf 340 mg-%, in der Niere auf 150 mg-% und in der Leber auf 185 mg-%. Der prozentuelle Anstieg war also in der Leber wesentlich größer als in der Niere. Bei Mäusen waren die Werte für das Gehirn von 160 mg-% auf 280 mg-% und für die Leber von 90 mg-% auf 170 mg-% gestiegen.

Die Frage, auf welchem Wege diese hohe Konzentration im Gehirn zustande kommt, soll hier nicht weiter erörtert werden. Auf einige sich widersprechende Befunde anderer Autoren ist aber hinzuweisen. Schwerin u. Mitarb. fanden nach Injektionen von Glutaminsäure und Glutamin, daß beide in beträchtlichen Mengen in Leber und Niere gespeichert wurden, während im Gehirn keine signifikante Änderung der Konzentration nach Glutaminsäureinjektionen eintrat. Nach Tigerman und MacVicar soll aber eine glutaminsäurereiche Proteindiät, sie verfütterten Zein, neben einer beträchtlichen Steigerung des Glutaminsäuregehaltes in anderen Geweben auch eine solche des Gehirns hervorrufen. Mit Casein, das einen geringeren Glutaminsäuregehalt aufweist, ließ sich eine solche Steigerung nicht erzielen. Boulanger u. Mitarb. fügten dem Blutstrom im Perfusionsversuch Glucose und Glutaminsäure zu und stellten fest, daß schon nach verhältnismäßig kurzer Zeit der Glutaminsäuregehalt des Plasmas um etwa 30% abnahm, dafür aber der des Gehirns, besonders in der grauen Substanz, beträchtlich zunahm. Waelsch dagegen verneint, zumindest unter seinen Versuchsbedingungen, eine Steigerung des Glutaminsäuregehaltes des Gehirns nach Glutaminsäureinjektionen. Eine Erklärung für die voneinander abweichenden Befunde der Autoren läßt sich noch nicht geben. Unabhängig davon ist zunächst einmal die Tatsache des erhöhten Glutaminsäure/Glutamingehaltes im Gehirn unter unseren Versuchsbedingungen im Zusammenhang mit der Frage der erhöhten Acetylcholinbildung im Gehirn nach l(+)-Glutaminsäurefütterung bedeutungsvoll.

2. Ausbleiben der Bradykardie bei glutaminsäuregefütterten Tieren nach Vagusdurchtrennung

Im Anschluß an unsere früheren Befunde einer Bradykardie nach längerer Glutaminsäurefütterung (Klotzsche) schienen uns Untersuchungen wünschenswert zur Stützung unserer Auffassung, daß diese Bradykardie zentral bedingt ist.

Wir haben zu diesem Zwecke 10 männlichen weißen Ratten, die eine elektrokardiographisch festgestellte durchschnittliche Schlagfrequenz von 550 Schlägen/min hatten, die Halsvagi durchtrennt. Die Schlagfrequenz stieg dadurch auf 720—750 Schläge/min an. Diese Frequenzsteigerung war durch Verfütterung unserer l(+)-Glutaminsäuredosis von 1,25 g/kg Körpergewicht über sechs Wochen nicht wieder herabzudrücken. Dieser Befund, zusammen mit der hohen Glutaminsäurekonzentration im Gehirn (vgl. Abschnitt 1), scheint uns für eine zentral bedingte Bradykardie durch erhöhte Acetylcholinbildung im Gehirn zu sprechen.

3. Der Antagonismus von Glutaminsäure und Folsäure

Die Arbeitshypothese, daß eine vermehrte Acetylcholinbildung im Gehirn nach Glutaminsäurefütterung zu einer zentral bedingten Bradykardie führt, regte uns zu weiteren Untersuchungen an.

1948 berichtete Davis (1—4), daß der Acetylcholingehalt des Serums von Perniciosakranken erheblich gesteigert ist und nach Folsäuregaben bzw. Leberextrakt eine Normalisierung eintritt. Ross u. Mitarb. beschrieben 1948 neurologische Veränderungen bei Perniciosakranken, die über lange Zeit mit Folsäure behandelt

worden waren, wobei diese Veränderungen häufiger waren, wenn täglich hohe Dosen verabreicht wurden gegenüber kleinen oder intermittierenden Gaben. Sie diskutierten, ob die Folsäure in großen täglichen Gaben einen schädigenden Einfluß auf das Zentralnervensystem ausübt und vermuteten, daß sie den Stoffwechsel der l(+)-Glutaminsäure im Zentralnervensystem stört, möglicherweise im Sinne einer Störung der Bildung oder der Funktion von Acetylcholin. Da nach HAWKINS weder die echte noch die Pseudocholinesterase durch Folsäure in irgendeiner Weise beeinflußt wird, muß diesem Vorgang ein noch unbekannter Mechanismus zugrunde liegen.

Der Bradykardietest an der weißen Maus schien geeignet, auch die gegenseitige Beeinflussung zwischen Folsäure und Glutaminsäure zu prüfen.

40 männliche weiße Mäuse im Gewicht von 18—22 g wurden 6 Wochen lang in der üblichen Weise mit l(+)-Glutaminsäure gefüttert. Anschließend wurde die Schlagfrequenz elektrokardiographisch festgestellt und die Fütterung weitere 4 Tage fortgesetzt. Zusätzlich erhielten diese Tiere in diesen 4 Tagen je 1 mg Folsäure pro 20 g Körpergewicht täglich subcutan. Die Folsäure

Tabelle 1

lfd. Nr.	Schlagfrequenz nach 6-wöchiger Fütterung mit l(+)-Glutaminsäure	Schlagfrequenz der gleichen Tiere nach zusätzlicher Folsäureapplikation über 4 Tage	lfd. Nr.	Schlagfrequenz nach 6-wöchiger Fütterung mit l(+)-Glutaminsäure	Schlagfrequenz der gleichen Tiere nach zusätzlicher Folsäureapplikation über 4 Tage
1	180	420	21	480	600
2	240	480	22	480	600
3	240	480	23	480	660
4	240	480	24	480	660
5	240	540	25	480	660
6	300	480	26	480	720
7	300	600	27	540	600
8	360	480	28	540	660
9	360	540	29	540	720
10	360	540	30	540	720
11	360	540	31	540	720
12	360	600	32	540	720
13	420	540	33	600	660
14	420	660	34	600	720
15	420	660	35	600	780
16	420	660	36	600	780
17	420	660	37	660	720
18	480	540	38	660	780
19	480	600	39	660	660
20	480	600	40	660	660

In Spalte 2 ist die Schlagfrequenz nach sechswöchiger Fütterung mit l(+)-Glutaminsäure angegeben, in Spalte 3 die nach viertägiger zusätzlicher Folsäureapplikation. Der Absatz zwischen lfd. Nr. 26 und 27 trennt die Bradykardietiere von denen mit normaler Frequenz, der zwischen 38 und 39 die normalen von den vollkommen unbeeinflußten.

wurde durch tropfenweises Zugeben von 0,05 n Natronlauge gelöst, wobei darauf geachtet wurde, p_H 7 nicht nach der alkalischen Seite zu überschreiten, und dann mit Wasser aufgefüllt. Nach diesen 4 Tagen wurde wiederum die Schlagfrequenz im EKG geprüft. Wie in unseren früheren Versuchen galt als Bradykardie eine Schlagfrequenz unter 500 Schlägen pro Minute. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Aus der Tabelle ergibt sich, daß nach sechs Wochen Fütterung von 40 Tieren 26 eine Bradykardie haben, d. h. 65%. Nach der Applikation von Folsäure haben außer den 14 Tieren, deren Schlagfrequenz noch normal geblieben war, weitere 20 wieder eine normale Schlagfrequenz und nur noch 6 eine Bradykardie. Bei diesen Tieren hat sich aber die Frequenz von durchschnittl. 240 Schlägen/min auf durchschnittl. 470 erhöht. Auffallend ist weiter, daß bei 12 von 14 Tieren mit noch normaler Schlagfrequenz diese nach der Folsäureapplikation ebenfalls noch ansteigt, so daß nur bei 2 Tieren (Nr. 39 und 40) die Schlagfrequenz durch Folsäure nicht verändert wird.

Durch hohe subcutane Folsäuregaben gelingt es also, an der Maus die Bradykardie nach Glutaminsäurefütterung weitgehend aufzuheben. Entsprechend unserer Arbeitshypothese, daß diese Wirkung sich über die Acetylcholinbildung im Gehirn vollzieht, erschien es lohnenswert zu prüfen, ob Folsäure auch in der Lage ist, bereits gebildetes Acetylcholin, das infolge einer Cholinesterasehemmung nicht aufgespalten wird, in seiner Wirksamkeit zu hindern. Unter diesen Umständen müßte die Giftigkeit cholinesterasehemmender Pharmaka in ihrem cholinergischen Anteil vermindert werden.

Wir haben zu diesem Zwecke männlichen weißen Mäusen im Gewicht von 15—20 g 4 Tage lang täglich 1 mg/20 g Körpergewicht Folsäure, deren Lösung in der bereits beschriebenen Art und Weise geschah, subcutan injiziert. Am vierten Tage erhielten die Tiere außerdem Diäthyl-isopropylmethylpyrimidyl-thiophosphorsäureester (Diazinon „Geigy"), emulgiert mit dem handelsüblichen Emulgator, mit der Schlundsonde verabreicht. Jede Gruppe bestand aus 5 Tieren, die 90, 100, 110, 120 und 130 mg/kg Wirkstoff erhielten.

Die LD^{50} war trotz der Folsäuregaben praktisch mit der unbehandelter Tiere identisch und betrug etwa 110 mg/kg, auch das Vergiftungsbild wies hinsichtlich seiner Intensität und Dauer keine Unterschiede auf.

Diese Befunde lassen sich mit aller Vorsicht so deuten, daß Folsäure keinen Einfluß auf bereits gebildetes Acetylcholin hat. Nach unseren Untersuchungen scheint es aber doch so, daß, entsprechend der Annahme von Ross u. Mitarb., die Bildung des Acetylcholins beeinflußt wird. Da wir aber zumindest im Zentralnervensystem der Glutaminsäure eine wichtige Rolle bei der Bildung von Acetylcholin zumessen können, liegt der Schluß nahe, daß die Beeinflußung des Glutaminsäurestoffwechsels durch Folsäure an diesem Punkt ansetzt. Das bedarf aber noch weiterer Klärung.

Zusammenfassung

Es wird zunächst über die Steigerung des Glutaminsäure/Glutamingehaltes einzelner Organe nach Fütterung hoher Dosen Glutaminsäure berichtet, weiterhin die Frage zu klären versucht, ob die nach Fütterung hoher Glutaminsäuredosen auftretende Bradykardie zentralen Ursprungs ist. Schließlich wird auf die Beeinflußung des Glutaminsäurestoffwechsels durch Folsäure eingegangen, die als Störung der Acetylcholinbildung gedeutet wird.

Literatur

Boulanger, P., R. A. Griffié, R. Osteux: J. Physiol. (Paris) **42**, 554 (1950). — Davis, J. E.: (1) Science (Lancaster, Pa.) **10**, 437 (1946); (2) Amer. J. Physiol. **147**, 404 (1946); (3) Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **63**, 287 (1946); (4) Amer. J. Digest. Dis. **15**, 52 (1948). — Haber, C. and L. Saidel: Federat. Proc. **7**, 47 (1948). — Hac, L. R., E. E. Snell and R. I. Williams: J. of Biol. Chem. **159**, 273 (1945). — Hawkins, R. D.: Arch. of Biochem. **17**, 97 (1948). — Klotzsche, C.: Arzneimittel-Forsch. **4**, 85 (1954). — Ross, J. F., H. Belding and R. C. Paegel: Blood **3**, 68 (1948). — Schwerin, P., S. P. Bessman and H. Waelsch: J. of Biol. Chem. **184**, 37 (1950). — Tigerman, H. and R. W. MacVicar: J. of Biol. Chem. **189**, 793 (1951). — Waelsch, H.: Lancet **1949**, 1.

Dr. Claus Klotzsche, Bundesgesundheitsamt, Max von Pettenhofer-Institut, Abt. für Physiologie und Pharmakologie, Berlin-Dahlem

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 414—426 (1956)

Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie der Masaryk Universität, medizinische Fakultät, in Brünn (Vorstand: Professor Dr. med. und Dr. rer. nat. V. Uher)

Beeinflussung der Streßantwort des Thymus und der Hibernationsdrüse* der Ratte durch Veränderung der Reaktionslage des Nervensystems

Von

Z. Vlašín und J. Filkuka

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. September 1955)

Der thymolymphatische Apparat bildet im Körper ein Ganzes, dessen Fähigkeit auf verschiedene Belastungen zu reagieren, schon lange bekannt ist. Als erster beschrieb Hammar 1905 die Atrophie des Thymus nach Hungern. Er schlug die Benennung akzidentelle Involution des Thymus vor, zum Unterschied von der Involution, die physiologisch im Verlaufe des Alterns eintritt. Seit dieser Zeit wurde eine ganze Reihe von Stoffen und die Involution verursachenden Einflüssen beschrieben (vgl. Monographie von Tesseraux, 1953). Von den Stoffen, die sich im Körper befinden, sind es vor allem die Geschlechtshormone und die Steroide der Nebennierenrinde (Dougherty, 1952). Diese sind besonders wichtig, denn über die Nebenniere und ihre Hormone kommt der lympholytische Einfluß einer ganzen Reihe scheinbar nicht homogener Faktoren, vielfach nocizeptiven Charakters, zur Geltung. Unter ihrem Einfluß aktiviert sich das Hypothalamus-Hypophysensystem und durch die reichlichere Bildung des hypophysären ACTH wird die Absonderung der Corticoiden aus der Nebennierenrinde mobilisiert. Im Organismus kommt es zu funktionellen und morphologischen Veränderungen in der Nebenniere und anderen Organen, zu Blutveränderungen und zu einer Reihe metabolischer Äußerungen. Selye faßt diese im Organismus unter dem Einfluß einer nichtspezifischen Belastung sich vollziehenden Vorgänge unter dem sogenannten Allgemeinen Anpassungssyndrom zusammen, dessen erste Phase eine Alarmreaktion ist. Eine der typischen Erscheinungen dieser Reaktion ist die Involution des thymolymphatischen Apparates (Selye, 1946, 1949, 1950, 1951, 1953).

Bei der Alarmreaktion oder direkt nach der parenteralen Verabreichung von ACTH oder Glucocorticoiden entsteht im Thymus eine Hemmung der Mitosen (Sandritter, 1952). Die Thymocyten zerfallen innerhalb weniger Stunden und ihre Überreste liegen frei im Thymus in Gestalt von Hyalinkörperchen. Teilweise werden die Zellgewebereste durch Makrophagen in die regionalen Lymphdrüsen getragen, so daß ihre Sinusoide voll von zerriebenem, nuclearem Abfall sind. Die Zellen des Reticulum zeigen Anzeichen von Hypertrophie und Hyperplasie. Im Mark nehmen die Lymphocyten zu, so daß ein Bild eines sogenannten

* Winterschlafdrüse.

invertierten Thymus entstehen kann. Die Lymphocyten der Lymphdrüsen sind weniger empfindlich und zerfallen nicht so leicht. Die Desintegration beginnt hier in den Flemmingischen Zentren, die sich in sogenannte Hellmansche Reaktionszentren verwandeln (Selye, 1946, 1950, Tesseraux, 1953).

Auch die Hibernationsdrüse ist ein empfindlicher Indicator des Katabolismus im Verlaufe einer Alarmreaktion. Diese Drüse kommt bei Säugetieren vor und zwar nicht nur in typisch interskapularer Lokalisierung, sondern auch im Bereiche des Brustkorbes, des Halses, axillär, renal und inguinal. Beim Menschen erscheint sie regelmäßig in der Embryonalperiode. Die histologische Struktur dieser Drüse erinnert an andere endokrine Drüsen. Ihre epithelartigen Zellen sind von einem reichen Capillar- und Nervennetz umgeben. Sie enthalten einen sphärischen Kern, gewöhnlich in zentraler Lage, und außerdem reichlich Glykogen und Lipoiden (Sheldon, 1924, Rassmussen, 1923). Während der Anfangsphase der Alarmreaktion werden aus dieser Drüse Lipoidgranula ausgeschwemmt. Ihre Freigabe verläuft annähernd parallel der Eliminierung sudanophilen Materials aus der Nebenniere. Diese Veränderungen wurden auch bei epinephrektomierten Tieren beobachtet (Selye und Timiras, 1949). Demgegenüber erhöht sich bei Verabreichung von Cortison die Menge der Lipoide in dieser Drüse (Lachance, 1953, Aronson und seine Mitarbeiter, 1954).

Die Theorie des Allgemeinen Anpassungssyndromes wurde stark kritisiert. Die Wertung dieser Problematik würde den Rahmen der vorliegenden Arbeit überschreiten. Man kann allerdings sagen, daß die Alarmreaktion sich im Organismus wirklich abspielt und daß sie vorwiegend eine nervöse Erscheinung ist (Charvát, 1954). Sie ist allerdings nur ein Teil der bei plötzlicher Gefahr entstehenden Prozesse. Erkennt man die führende Rolle der Hirnrinde und der Unterrinde an, so kann man diese Theorie in die Corticoviscerale Pathologie eingliedern (Hetenyi, 1953).

Über die Rolle der nervösen Einflüsse bei der Alarmreaktion existieren derzeit nur wenig Belege. Wir haben uns die Aufgabe gestellt, festzustellen, wie die Streßantwort des Thymus und der Hibernationsdrüse durch die Veränderung der Erregungslage des Nervensystems beeinflußt wird.

Methodik

Es wurden weiße Ratten (Männchen und Weibchen) heimischer Zucht mit einem Durchschnittsgewicht von 180 g, gefüttert mit gemischter Nahrung in welcher Kohlenhydrate überwogen, benutzt. Der Versuch gliedert sich in zwei Teile:

I. *Dämpfung durch Phenobarbital.* Die Ratten wurden in 3 Gruppen geteilt. In der *ersten* Gruppe (Hauptgruppe) wurden 8 Ratten durch intraperitoneale Injektion von Phenobarbital 0,015 g auf 100 g Körpergewicht betäubt. Nach

30 min, als die Tiere bereits schliefen, wurden 40% Formol 0,1 cm³/100 g intramuskulär injiziert. 3 Std später wurde eine zweite Dosis Formol 0,05 cm³/100 g gegeben.

Abb. 1. Die Karyoklasie in der Rindenpartie des Thymus. Hämatoxylin-Eosin, unter Vergrößerung 500 mal

In der *zweiten* Gruppe erhielten 6 Ratten nur eine Formolbelastung in gleichen Dosen und zur gleichen Zeit.

In der *dritten* Gruppe wurden 6 Ratten nur mit Phenobarbital in gleichen Dosen wie in der ersten Gruppe eingeschläfert.

Alle Tiere wurden durch Ätherinhalation 6 Std nach der ersten Formolinjektion oder 6½ Std nach der Verabreichung von Phenobarbital getötet. Der Thymus

samt den umliegenden Geweben, d. h. einschließlich der Thorakalhibernationsdrüse und der mediastinalen Lymphdrüsen, wurde präpariert. Die Fixierung der Organe geschah durch eine Lösung gemäß Stieve. Es wurden Schnitte in zwei aufeinander senkrechten Ebenen angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. In großer Mehrzahl der Fälle ermöglichte uns diese Wahl der Schnitte die mediastinalen Lymphknoten zu erfassen. Der Grad der Freigabe von Granula der Hibernationsdrüse wurde mit Hilfe des Phasenkontrastes verfolgt.

II. *Strychninexzitation.* Die Ratten wurden nach der Methode von Farish und Griffith epinephrektomiert. Nach der Epinephrektomie erhielten sie kochsalzreiche Nahrung und zum Trinken eine physiologische Kochsalzlösung. Der eigentliche Versuch begann 24 Std nach der Epinephrektomie.

In der *ersten* Gruppe (Hauptgruppe) erhielten 11 Ratten eine intramuskuläre Injektion von Formol 0,1 cm^3/100 g zu Beginn des Versuches und 0,05 cm^3/100 g nach 3 Std. 30 min vor der ersten Formolverabreichung und unmittelbar vor der zweiten Dosis erhielten die Ratten Strychninum nitricum 0,037 mg/100 g als erste und 0,025 mg/100 g als zweite Injektion.

In der *zweiten* Gruppe wurde 4 Ratten nur Formol ohne Strychninvorbehandlung gegeben.

In der *dritten* Gruppe erhielten 3 Ratten nur Strychnin in der gleichen Zeit und in denselben Dosen wie in der ersten Gruppe.

Durch Ätherinhalation wurden die Ratten 6 Std nach der ersten Formolinjektion oder $6^1/_2$ Std nach der ersten Strychnindosis getötet. Das gewonnene Material wurde wie beim ersten Teil des Versuches bearbeitet.

Ergebnisse

Die Phenobarbitaldämpfung verhinderte unter unseren Versuchsbedingungen nicht die Karyoklasie des Thymus (Abb. 1) und der Lymphdrüsen. Der Zerfall war mindestens ebenso groß wie bei den Kontrolltieren, wenn nicht sogar größer. Durch die Dämpfung wurde aber den Belastungsveränderungen in der Hibernationsdrüse vorgebeugt, die ihre normale Struktur mit reichlichem Inhalt von lipoiden Granula beibehielt (Abb. 2). Bei Ratten, die nur mit Formol ohne Vorbehandlung belastet wurden, kam es sowohl zu Karyoklasie im Thymus und in den Lymphknoten, als auch zur Ausschwemmung von Lipoidgranula aus der Hibernationsdrüse (Abb. 3). In den Lymphdrüsen dieser Gruppe war Karyoklasie vor allem in den Reaktionszentren nachzuweisen (Abb. 4), was mit den Ergebnissen der vorhergehenden Gruppe übereinstimmte. In beiden Gruppen wurde die Proliferation des Thymusreticulum mit Bildung hypertrophischer Retikularzellen erhöht. Bei den Ratten, die nur Phenobarbital erhielten, wurde Ruhezustand des Thymus, der Lymphknoten und der Hibernationsdrüse gefunden. In den Lymphdrüsen dieser Gruppe war nur die Zahl der Makrophagen erhöht. Bei den Gruppen, in denen es zu Karyoklasie kam, war diese nicht in allen Fällen gleich groß, obzwar die Nahrung einheitlich war und die Dosen genau nach dem Gewicht verabfolgt wurden.

Bei epinephrektomierten Ratten kam es zu keinem Zerfall der thymolymphatischen Strukturen durch die Belastung. Diese negative

Reaktion, üblich bei epinophrektomierten Ratten, wurde durch die Strychninexzitation nicht verändert. In keiner der Gruppen kam es zu

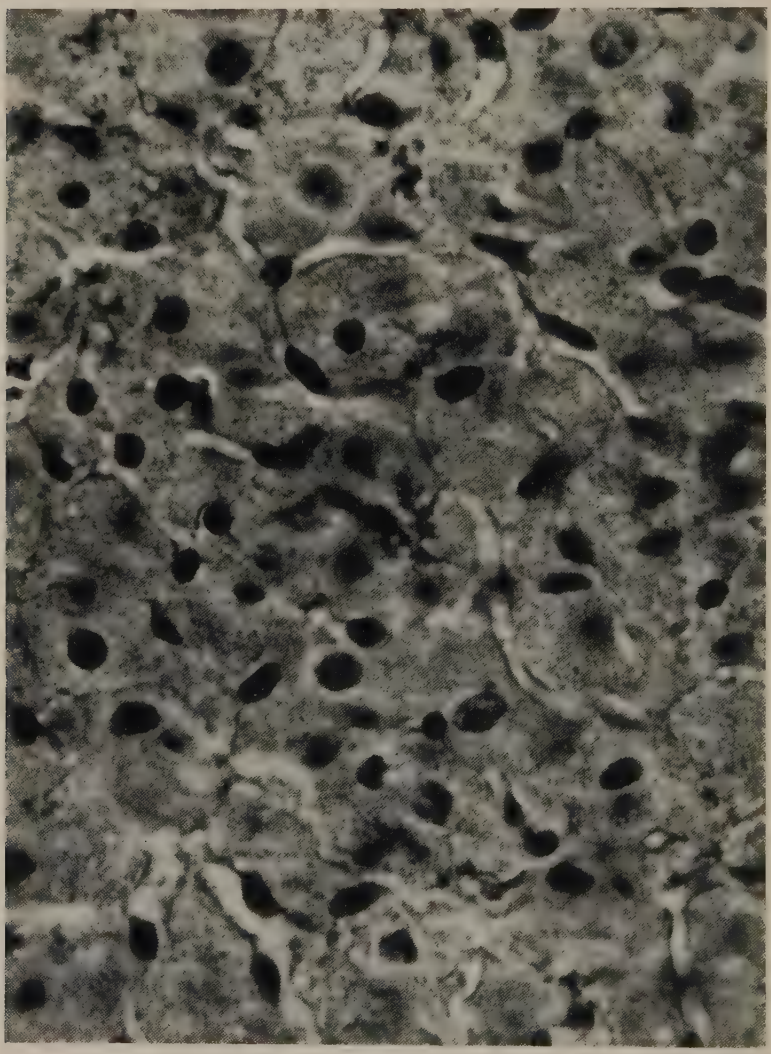


Abb. 2. Der Ruhezustand der Winterschlafdrüse. In den Zellen kann die feine Granulation beobachtet werden. Hämatoxylin-Eosin, Vergrößerung 500 mal. Phasenkontrast

einem Zerfall im Thymus, sondern es wurde nur eine leichte bis mittelmäßige Karyoklasie in den Reaktionszentren der mediastinalen Lymphknoten beobachtet; diese war am schwächsten bis beinahe negativ in der Gruppe, die nur Strychnin erhielt, am stärksten in jener Gruppe.

Tabelle 1

Gruppen der Tiere	Zahl der Tiere	Karyoklasie		Ausschwemmung von Lipoiden aus der Winterschlafdrüse
		im Thymus	in den Reaktionszentren der Lymphknoten	
Normale Ratten				
Pharmakologische Dämpfung mittels Phenobarbital kombiniert mit Streß	8	++++	++++	—
Streß	6	+++	+++	+++
Pharmakologische Dämpfung	6	—	—	—
Epinephrektomierte Ratten				
Strychninexzitation kombiniert mit Streß	11	—	++	—
Streß	4	—	+	+++
Strychninexzitation	3	—	±	—

Übersicht der Versuchsergebnisse erzielt durch histologische Bearbeitung. Der Grad der Reaktion wurde durch die Anzahl von Kreuzen bezeichnet, nähere Erklärung siehe Text.

in welcher die Belastung mit gleichzeitiger Exzitation kombiniert wurde. Ein Wirkungsunterschied zeigte sich wiederum bei der Hibernationsdrüse. Bei den mit Strychnin exzitierten Ratten kam es durch die Streßwirkung nicht zur Ausschwemmung von lipoiden Granula aus der Hibernationsdrüse. Nach Formolbelastung ohne gleichzeitige Vorbehandlung kam es zu deren Ausschwemmung; Strychnin allein hatte diese Wirkung nicht.

Diskussion

Durch die verschiedene Antwort des Thymus und der Hibernationsdrüse auf die Streß wird die Tatsache bestätigt, daß diese beiden Organe im Verlauf einer Alarmreaktion nicht auf die gleiche Art reguliert werden. Die Beziehung des Nervensystems zur Hibernationsdrüse ist direkter als zum thymolymphatischen Apparate, bei welchem die Corticoide eine wichtige Rolle spielen. Dies ist schon daraus ersichtlich, daß die Veränderungen in der Hibernationsdrüse im Verlauf der Alarmreaktion auch dann vor sich gehen, wenn wir die Nebennieren beseitigen (Selye, 1950). Das gilt nicht für den Thymus, denn die Epinephrektomie verhütet den Zerfall des thymolymphatischen Gewebes während der Alarmreaktion (Selye, 1950, Frank u. Mitarbeiter, 1953). Die Wirkung der Corticoide auf das thymolymphatische System ist auch in vitro erwiesen; Bedingung hierfür ist allerdings die Erfüllung bestimmter Bedingungen (Hechter und Johnson, 1949, Schrek, 1951, Frank und Dougherty, 1953). Die Frage des Zerfalles der thymolymphatischen

Strukturen und gleichzeitig auch anderer Veränderungen im Verlaufe der Alarmreaktion ist aber nicht nur eine Frage der Corticoide. Es zeigte sich, daß die Corticoide, obzwar notwendig, doch nicht ganz allein für

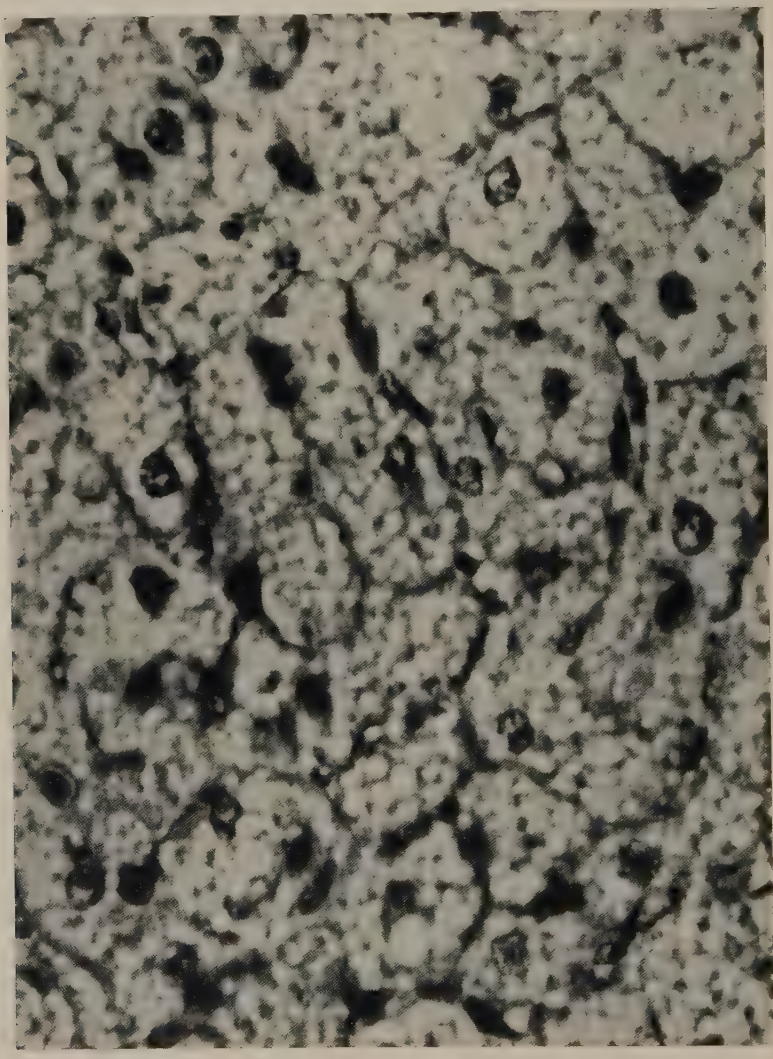


Abb. 3. Die Entleerung der Winterschlafdrüse nach Formolbelastung. Hämatoxylin-Eosin, Vergrößerung 500 mal. Phasenkontrast

Veränderungen während der Alarmreaktion verantwortlich sind. Es wurde schon nachgewiesen, daß nach Verabreichung einer kleinen Dosis von Corticoiden, die allein keine für eine Alarmreaktion typischen Veränderungen bewirkt, der der Nebennieren beraubte Körper ebenso

bezeichnend auf die Streß bzw. auf die Verabreichung von ACTH reagiert, wie wenn er die Nebennieren besäße (Kendall, 1941, Selye u. Dosne, 1941, Ingle u. Mitarbeiter, 1947, Engel, 1952, Muehrcke u. Mitarbeiter, 1952). Für den Thymus erwies diese Wirkung Herlant (1950). Er gab Ratten nach Epinephrektomie eine kleine Dosis von Nebennierenrindenextrakt und setzte sie der Belastung durch Kälte, Muskelanstrengung und Formol aus. Bei allen trat Thymolyse ein, welche in bezug auf das Ausmaß, den Veränderungen bei normalen, denselben Bedingungen ausgestellten Tieren entsprach. Aus dem Zitierten ist ersichtlich, daß sich bei Anpassungsveränderungen, vermittelt durch das System Hypothalamus-Hypophysis-Nebenniere auch andere Faktoren geltend machen als nur das Hormonalsystem. Selye nennt sie „bedingende Faktoren". Diese können für den Umfang der Veränderungen bei der Alarmreaktion eine größere Bedeutung haben, als der Grad der Aktivität des Hypophysis-Nebennierensystems. Unter der Voraussetzung, daß unter diesen Faktoren das Nervensystem die Hauptrolle spielt, bemühten wir uns die Streßantwort durch Veränderung seiner Reaktionslage zu beeinflussen. Beim Thymus war das Ergebnis negativ, sowohl bei Anwendung von pharmakologischer Dämpfung als auch von Exzitation.

Als Belastung wurden Formolinjektionen verwendet. Die Wirkung des Formol im lebenden Gewebe wird durch Einschrumpfung der Gewebeproteine eingeleitet — es entsteht Koagulationsnekrose. Diese Wirkung führt notwendigerweise zu einer mächtigen Reizung der Interoreceptoren. Die Reizung wird zentripetal mittels afferenter Nervenbahnen geleitet (Thalhammer, 1952, Sturm, 1954). Infolge dieser Reizung entsteht in der Gehirnrinde eine überlimitierte Dämpfung, wodurch die induktive Aktivität der hypothalamischen Zentren und dadurch auch die Funktion des Systems Hypothalamus-Hypophysis-Nebenniere erhöht wird (Hetenyi, 1953). Die Frage der Aktivierung dieses Systems ist allerdings bedeutend komplizierter, es machten sich hierbei auch humorale Bestandteile geltend, wie z. B. die Herabsetzung der Konzentration der Rindenhormone im Blut durch Verbrauch in den Geweben (Sayers, 1950).

Die Unfähigkeit der Barbiturate Streßveränderungen zu verhindern, ist nicht überraschend. Schon Olah u. Mitarbeiter, 1951, stellten fest, daß die Barbiturate die durch Pikrotoxine verursachte Eosinopenie hemmen, was aber nicht für durch Formol bewirkte Eosinopenie gilt. Ähnlich zeigten Ronzoni u. Mitarbeiter (1950), daß bei Ratten, die durch Barbiturate tief anaesthesiert wurden, zwar die Ausschwemmung von Ascorbinsäure aus den Nebennieren, verursacht durch Kälteeinwirkung, verhindert wird, daß aber nach Blutung und Wärme die Barbiturate versagen.

Die Wirkung der Barbiturate läßt sich nicht ganz einfach im Sinne bloßer Herabsetzung der Funktion bestimmter Abteilungen des Nervensystems auslegen. Gemäß Bykov (1952) spiegelt sich jede Veränderung im Stande oder in der Tätigkeit des zentralen Nervensystems in einer Dynamikveränderung der

interorezeptiven Reflexe ab. Bei der Verabreichung von Barbituraten ist die Dosierung von großer Wichtigkeit, denn der Verlauf der interorezeptiven Reflexe wird durch eine bestimmte Dosierung intensiviert. Eine Erhöhung der Dosierung schwächt

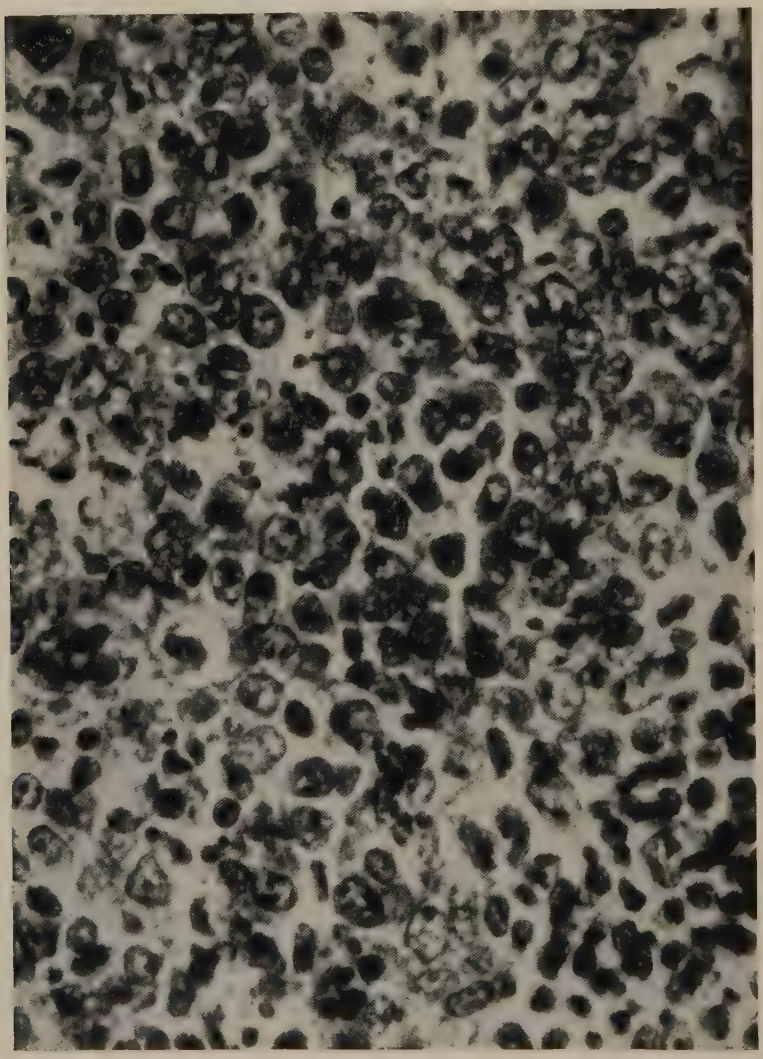


Abb. 4. Der Zerfall in dem Reaktionszentrum der Lymphdrüse. Hämatoxylin-Eosin, Vergrößerung 500 mal

diese Reflexe bis zur Dämpfung ab (Gero, 1954). Bei unseren Ratten war die Narkose nicht die tiefste, denn sie reagierten durch Reflexbewegungen der Gliedmaßen auf die schmerzlichen Reizungen. Es ist möglich, daß es bei diesen Tieren zu einer Verstärkung der interorezeptiven Reflexe kam. Andererseits sollte Phenobarbital

als thalamisches Narkoticum (Rosenow, 1951) das System Hypothalamus-Hypophysis-Nebenniere durch Herabsetzung der Funktion der Hypothalamuszentren blockieren. Die Hypophyse kann allerdings durch bestimmte Arten von Belastung auch nach Unterbrechung ihres funktionellen Zusammenhanges mit dem Hypothalamus durch Transplantation in die Augenvorkammer aktivisiert werden (Fortier, 1951). Im Gegenteil steigt die Aktivität des Systems nach ihrer Denervation durch Durchschne dung des Stieles der Hypophysis (Simms u. Mitarbeiter, 1951), was mit dem Gesetz von Cannon über die Denervation übereinstimmt. Man kann nicht entscheiden, inwieweit sich eine oder die andere dieser Einwirkungen geltend machte.

Bei der Anwendung der Exzitation durch Strychnin gingen wir von folgenden Voraussetzungen aus: Nach Epinephrektomie kommt es zu keiner durch Streß verursachten Thymolyse. Herlant (1950) beschrieb aber nach dieser Operation eine leichte Karyoklasie in den Lymphdrüsen infolge der Streßwirkung. Seine Versuche wurden 24 Std nach Epinephrektomie vorgenommen. Wir nehmen deshalb an, daß bei dieser Versuchsmodifikation Corticoide wenigstens in Spuren vorhanden sein werden. Wenn das Nervensystem ein wichtiger extraadrenaler Faktor bei der Alarmreaktion ist, dann sollte seine Exzitation den Zerfall der thymolymphatischen Strukturen erhöhen.

Unsere Voraussetzungen erfüllten sich nicht. Das ist absolut kein Beweis für die Nichtbeteiligung des Nervensystems bei der Alarmreaktion. Wir wissen, daß andere die Funktion des Nervensystems beeinflussende Stoffe den Verlauf der Veränderungen bei der Alarmreaktion zu modifizieren vermögen.

Das sind z. B. Ganglioplegica, welche auf bestimmte Dauer die Entstehung der Eosinopenie hemmen (Louwerens u. Smelik, 1953), eine Erscheinung, die ausschließlich als hormonal gehalten wurde (Halberg, 1952, Haus u. Lammers, 1952). In ähnlicher Weise blockieren Ganglioplegica die Abgabe von Lipoiden aus den Nebennieren nach der Streßeinwirkung (Arezio-Beruzzo, 1953). Auch die pharmakologische Hibernation vermag mittels Phenothiazinderivaten die Funktion des Hypothalamus-Hypophysis-Nebennierensystems wesentlich herabzusetzen (Jentzer u. Mitarbeiter, 1954). Der Wirkungsort dieser Stoffe ist die substantia reticularis, die eine Art von Relais zwischen den efferenten Bahnen ist (Laborit, 1954). Außerdem kann man nicht mechanisch die Ergebnisse von Versuchen an Ratten auf andere Organismen übertragen, besonders wenn sie einen höheren Grad der Nerventätigkeit aufweisen als die Ratten (z. B. der Mensch, der Hund).

Bei der Hibernationsdrüse waren unsere Ergebnisse positiver. Die Ausschwemmung von Lipoiden aus dieser Drüse geschieht unter dem Einfluß des Sympathicus. Das Zentrum für die Regulation dieser Wirkung ist das Tuber cinereum (Lejtès, 1952). Die Bedeutung des Nervensystems für die Regulierung des Lipoidgehaltes dieser Drüse bestätigen Versuche mittels Denervierung. Die denervierte Drüse reagiert während des Hungerns durch eine bedeutend verlangsamte Abgabe von Lipoiden. Demgegenüber erhöht sich im normalen Ernährungszustand der Gehalt an Lipoiden in den Zellen der denervierten Drüse

(Hausberger, 1934—1937). Die nach Denervierung erzielten Ergebnisse stimmen mit denen überein, die wir nach Kombination der Belastung mit pharmakologischer Dämpfung mittels Phenobarbital erzielten. Weniger klar ist das erreichte Resultat, daß es auch nach Strychninexzitation nicht zu einer Ausschwemmung von Lipoiden als Streßantwort kam. Vielleicht kann dieses Ergebnis durch das Gesetz von Wilder über die Ausgangswerte bzw. durch die Lehre von der Parabiose (Vvědénsky) erklärt werden.

Zusammenfassung

Es wurde versucht, die Antwort auf Formolstreß bei Ratten durch eine Veränderung der Reaktionslage des Nervensystems zu beeinflussen. Die Streßveränderungen des Thymus, der mediastinalen Lymphdrüsen und der thorakalen Hibernationsdrüse wurden beobachtet. Der Gehalt an Granula in dieser Drüse wurde unter Zuhilfenahme des Phasenkontrastes bestimmt.

1. Die pharmakologische Dämpfung mittels Phenobarbital verhinderte bei unseren Versuchsbedingungen nicht die Karyoklasie im Thymus und den Lymphdrüsen, die durch Streß bewirkt wurde.

2. Die Strychninexzitation veränderte keineswegs die Antwort des thymolymphatischen Apparates der epinephrektomierten Ratten auf Streß. Es kam zu keiner Karyoklasie im Thymus, weder in der Versuchsgruppe, noch bei den Kontrolltieren. Es wurde aber eine leichte bis mittelmäßige Karyoklasie in den Reaktionszentren der Lymphknoten beobachtet.

3. Nach der pharmakologischen Dämpfung mittels Phenobarbital wurde die Antwort auf die Formolbelastung mit wesentlicher Verlangsamung der Ausschwemmung lipoider Granule aus der Hibernationsdrüse gegeben.

4. Bei Formolstreß, verbunden mit gleichzeitiger Strychninexzitation, wird gleichfalls die Ausscheidung der Lipoidgranula aus der Hibernationsdrüse bei epinephrektomierten Ratten verhindert. Bei Versuchstieren ohne gleichzeitige Exzitation findet sich eine Ausschwemmung von Lipoiden nach Formolbelastung ein.

Literatur

Arezio, G., et L. Beruzzo: Histochimie de la surrénale du rat sous hexaméthonium dans le stress. Anesth. et Analg. **10**, 371 (1953). — Aronson, S. M., C. V. Teodoru, M. Adler and G. Schwartzman: Influence of cortisone upon brown fat of hamsters and mice. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **85**, 214 (1954). — Bykov, K. M.: Mozková kůra a vnitřní orgány. Zdravotnické nakladatelství, Praha 1952. — Dougherty, T. F.: Effect of hormones on lymphatic tissue. Physiologic. Rev. **32**, 379 (1952). — Engel, F. L.: On the nature of the interpendence of the adrenal cortex, non specific stress and nutrition in the regulation of nitrogen

metabolism. Endocrinology (Springfield, Ill.) **50**, 462 (1952). — Fortier, C.: Dual control of ACTH release: zit. nach Selye 1951. — Frank, J. A., and T. F. Dougherty: Cytoplasmic budding of human lymphocytes produced by cortisone and hydrocortisone in vitro preparations. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **82**, 17 (1953). — Frank, J. A., L. F. Kumagai and T. F. Dougherty: Studies on the rates of involution and reconstruction of lymphatic tissue. Endocrinology (Springfield, Ill.) **52**, 656 (1953). — Gero, J.: Zmeny interoreceptivnych reflexov po hypnotikách. Československá fysiologie **3**, 388 (1954). — Halberg, F.: Some correlations between chemical structure and maximal eosinopenia in adrenalectomized and hypophysectomized mice. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **106**, 135 (1952). — Hammar, J. A.: zit. nach Dougherty 1952. — Hausberger: zit. nach Lejtěs 1952. — Hauss, W. H., u. L. I. Lammers: Einfluß der Epinephrektomie auf das akute Syndrom. Klin. Wschr. **1952**, 1087. — Hechter, C., and S. Johnson: In vitro effect of adrenal cortical extract upon lymphocytolysis. Endocrinology (Springfield, Ill.) **45**, 351 (1949). — Herlant, M.: Conditioning through stress of the action of corticoids on lymphoid organs. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **3**, 399 (1950). — Hetenyi, G.: O koncepcii stressa i bolezni adaptacii Šelè. Acta med. (Budapest) **4**, 1 (1953). — Charvát, J.: Neurohumorální koncepce v endokrinologii. Sborník lékařský **56**, 150 (1954). — Ingle, D. J., O. E. Ward and M. H. Kuizenga: Relationship of adrenal glands to changes in urinary non-protein nitrogen following multiple fractures in force-fed rat. Amer. J. Physiol. **149**, 510 (1947). — Jentzer, A., N. Corboud u. A. Muller: Tierversuche und klinische Erfahrungen bei der Unterkühlungsanesthesie oder Hibernation. Der Anaesthesist **3**, 36 (1954). — Kendall, E. C.: The adrenal cortex. Archives of Pathology **32**, 474 (1941). — Laborit, H.: Potenzierte Narkose und künstliche Hibernation. Der Anaesthesist **3**, 918 (1954). — Lachance, J. P.: Hormonal factors influencing fat deposition in the interscapular brown adipose tissue of the white rat. Endocrinology (Springfield, Ill.) **52**, 57 (1953). — Lejtěs, S. M.: Obmen věščestv v žirovoj tkani i ego reguljacija. Uspechi Sovrem. Biol. **34**, 8 (1952). — Louwerens, B., and P. G. Smelik: The effect of hexamethonium chloride on the eosinopenic response during stress in rats. Acta endocrinol. (Copenh.) **14**, 27 (1953). — Muehrcke, R .C., T. W. Staple and R. M. Kark: Epinephrine eosinopenia in surgically induced Addison's disease. J. Labor a. Clin. Med. **40**, 169 (1952). — Olah, F., M. Jajoros, V. Varro, D. Bachrach and K. Kovacs: Mechanism of induced eosinopenia. Lancet **1951**, 802. — Rasmussen, A. T.: The so-called hibernating gland. J. of Morph. **38**, 147 (1923—24). — Ronzoni, E., M. Ackerman and J. Hadjiski: Sodium pentobarbital anesthesia and the response of the adrenal cortex to stress. Amer. J. Physiol. **160**, 499 (1950). — Rosenow, G.: The nervous-humoral regulation of the leukocytes. Acta haematol. (Basel) **5**, 1 (1951). — Sandritter, W.: Zur Bestimmung der Nebennierenrindeaktivität. Sonderdruck aus Freiburger Tagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie. 1952. — Sayers, G.: The adrenal cortex and homeostasis. Physiologic. Rev. **30**, 241 (1950). — Selye, H.: The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. J. of Clin. Endocrin. **6**, 117 (1946). — Selye, H.: Textbook of Endocrinology. Montreal: Acta, Inc. 1949. — Selye, H.: Stress. Montreal: Acta, Inc. 1950. — Selye, H.: Annual Report on Stress. Montreal: Acta, Inc. 1951. — Selye, H.: Der heutige Stand der Stress-konzeption. Münch. med. Wschr. **1953**, 426. — Selye, H., and C. Dosne: Influence of traumatic shock on blood sugar of adrenalectomized rat treated with adrenal cortical extract. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **48**, 532 (1941). — Selye, H., and P. S. Timiras: Participation of brown fat tissue in the alarm reaction. Nature (Lond.) **164**, 745 (1949). — Sheldon, E. F.: The so-called hibernating gland in mammals a

form of adipose tissue. Anat. Rec. **28**, 331 (1924). — Schrek, R.: Biologic assay of adrenal cortex hormones by the method of unstained cell counts. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **77**, 709 (1951). — Simms, E., M. Pfefenberger and P. Heinbecker: Neuro-endocrine and endocrine influences on the circulating blood elements. Endocrinology (Springfield, Ill.) **49**, 45 (1951). —Sturm, A.: Die Hypophysen-Nebennieren-Regulation in Beziehung zum vegetativen Nervensystem. Dtsch. Med. Wschr. **1954**, 741, 782. — Tesseraux, H.: Physiologie und Pathologie des Thymus. Leipzig: J. A. Barth 1953. — Thalhammer, O.: Über einen afferenten Weg der actio des „Stressors" zur Auslösung der Reaktion. Wien. klin. Wschr. **1952**, 729.

Dr. Z. Vlašín, Dr. J. Filkuka
Institut f. allgemeine u. experimentelle Pathologie d. Masaryk-Universität, Med. Fakultät, Brünn/CSR

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 427—435 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Untersuchungen am isolierten Vagus-Magenpräparat* **

Von
K. Greeff und P. Holtz

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. November 1955)

Pharmakologische Erregungs- und Hemmungswirkungen im Bereich des Magen-Darmtraktes können ihren Angriffspunkt sowohl an der glatten Muskulatur selbst als an nervösen Strukturen haben. Die Analyse dieser Wirkungen bedient sich häufig der mehr oder weniger großen Spezifität antagonistisch wirkender Stoffe. Eine auf Grund solcher Antagonismen durchgeführte Analyse würde aber nach der bekannten Formulierung von Rudolf Magnus keine Aussage über den normalen Angriffspunkt des betreffenden Pharmakons erlauben, sondern nur einen Hinweis auf seine mehr oder weniger große Affinität zu der reizbaren Struktur geben. So wird verständlich, daß die Spezifität pharmakologischer Antagonismen weitgehend dosisabhängig ist, indem sie oft nur für einen bestimmten — mehr oder weniger großen — Dosierungsbereich gilt und bei höherer Dosierung des Agonisten oder Antagonisten durchbrochen wird.

Im Gegensatz zu *pharmakologischen* Reizen, die in bezug auf die applizierte Menge des Pharmakons beliebig hoch dosiert werden können, ist dem *elektrischen* und *physiologischen* Reiz nach oben hin eine nicht überschreitbare Grenze gesetzt durch das Maximum an Überträgerstoff, der bei der Erregung an den nervösen Endstrukturen freigesetzt wird; andererseits ermöglicht bei elektrischer Reizung die Applikation der Elektroden an bestimmten Strukturen — z. B. prä- oder postganglionären Nervenstrecken, glatter Muskulatur — eine strenge Lokalisation des Reizes, während das in die Blutbahn oder bei isolierten Organen in die Badflüssigkeit gegebene Pharmakon möglicherweise verschiedene Strukturen gleichzeitig zu erregen vermag. Die Beeinflussung *physiologischer* und *elektrisch* ausgelöster Erregungsvorgänge durch Pharmaka ist deshalb eher geeignet, eine Aussage auch über den normalen Angriffspunkt des betreffenden Pharmakons zu erlauben.

---

* Über die Ergebnisse wurde auf der 21. Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Homburg-Saarbrücken berichtet [K. Greeff: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 121 (1955)].

** Herrn Prof. Dr. Otto Schaumann, Innsbruck zum 65. Geburtstag.

Unter diesem Gesichtspunkt haben wir die Methodik eines isolierten Vagus-Magenpräparates ausgearbeitet, das sowohl direkt als auch vom Nerven aus elektrisch erregbar ist, und die Wirkung einiger Pharmaka des vegetativen Nervensystems untersucht.

Methodik

Für die Versuche benutzten wir Meerschweinchen von 250—400 g Körpergewicht. Die Tiere wurden durch Nackenschlag getötet und entblutet; Abdomen und Thorax wurden eröffnet und der Magen mitsamt dem Oesophagus und den daraufliegenden Vagusnerven herauspräpariert. Die weitere Präparation erfolgte in warmer O_2-gesättigter Tyrodelösung: Eine Schnabelelektrode aus Plexiglas, in die 2 Platinstifte eingelassen waren, wurde 2—3 cm oberhalb des Magens den beiden Vagusnerven angelegt. An der Elektrodenhalterung wurde gleichzeitig, um eine Zerrung der Nerven zu vermeiden, auch der Oesophagusstumpf fixiert. Zur direkten Reizung des Magens führten wir, wie in der Abb. 1 schematisch dargestellt ist, eine Kugelelektrode als Kathode vom Magenfundus her in das Mageninnere hinein, als Anode diente eine großflächige Plattenelektrode außerhalb des Magens. Die Elektroden waren aus V_2A-Stahl angefertigt. Das Präparat wurde in einem Tyrodebad von 40 cm³ bei 35° C suspendiert und mit Hilfe einer Fritte reichlich mit O_2 versorgt. Die Tyrodelösung hatte folgende Zusammensetzung: 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g $CaCl_2$, 1,0 g $NaHCO_3$, 0,01 g $MgCl_2$, 0,05 g NaH_2PO_4, 2 g Glucose, Aqua dest. ad 1000 cm³. Zur elektrischen Reizung benutzten wir einen Rechteckimpulsgenerator. Die optimale Reizfrequenz lag zwischen 20—40 Hz, die Impulsdauer betrug bei Vagusreizung 0,5—1 msec, bei direkter Reizung 2—8 msec. Die zur Erzielung maximaler Kontraktionen notwendige Reizintensität lag bei der Vagusreizung zwischen 10 und 25 mA, bei der direkten Reizung zwischen 50 und 100 mA.

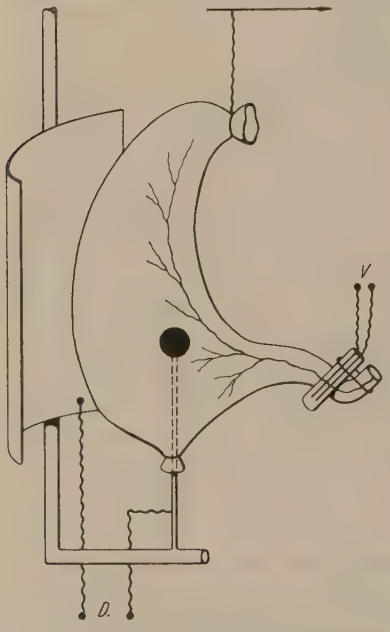


Abb. 1. Schematische Darstellung der Versuchsanordnung. Das Präparat befindet sich in einem Tyrodebad von 40 cm³. *D* Elektroden zur direkten elektrischen Reizung. *V* Elektroden zur elektrischen Vagusreizung

Bei den Untersuchungen, die an 52 Vagus-Magenpräparaten durchgeführt wurden, fanden folgende Substanzen Anwendung: Nicotin. tartar., Acetylcholinchlorid, Histaminchlorid, Atropin. sulfur., Hexamethonium-bromid (Squibb), Pendiomid-CIBA (N, N, N′, N′ -3-pentamethyl-N,N′-diäthyl-3-aza-pentylen-(1,5)-diammonium-dibromid), Penthonium und Buscopan (1-N-Butylscopolammoniumbromid) der Fa. Boehringer-Ingelheim, d-Tubocurarinchlorid (Asta), Opilon (Acetoxythymoxyäthyldimethylamin) der DIWAG AG., Dihydroergotamin (Sandoz)[1].

[1] Den Herstellerfirmen danken wir für die Überlassung der Präparate.

Versuche

1. Die Wirkung ganglionär blockierender Stoffe

Die Abb. 2 zeigt zunächst, daß sich am Vagus-Magenpräparat durch direkte und indirekte elektrische Reizung Kontraktionen auslösen lassen, deren Ausmaß von der Reizintensität abhängig ist. So ist in dem Versuch die Kontraktion bei Reizung des Vagus mit 25 mA deutlich stärker als bei Reizung mit 20 oder 15 mA. Bei direkter Reizung sind wesentlich höhere Reizintensitäten erforderlich, die dann aber auch eine wirkungsmäßige Abstufung erlauben. — Um mit *Acetylcholin* Kontraktionen ähnlichen Ausmaßes zu erreichen, sind relativ hohe Dosen erforderlich (10—20 γ). Von *Nicotin* werden hierzu 100—200 γ, von *Histamin* 20 bis 40 γ benötigt (Abb. 2 A). Die Effekte sind leicht reversibel und lassen sich über mehrere Stunden reproduzieren.

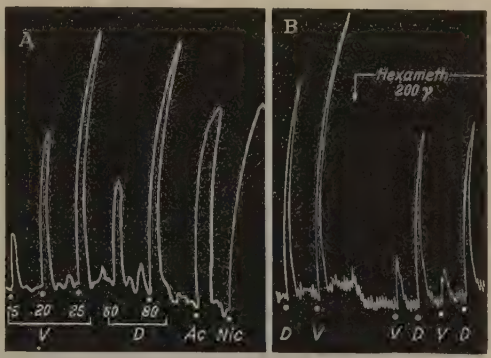


Abb. 2. *A*. Abgestufte Reizeffekte bei Anwendung verschiedener Stromstärken. *D* direkte elektrische Reizung (5 msec, 20 Hz, 20 sec). *V* elektrische Vagusreizung (0,5 msec, 20 Hz, 20 sec). (Die Zahlen in der Abbildung bedeuten Stromstärke in Milliampere.) Ac 10 γ Acetylcholin; Nic 200 γ Nicotintartrat. *B*. Blockierung des Vagusreizes durch Hexamethonium. *D* direkte Reizung (80 mA, 5 msec, 20 Hz, 15 sec). *V* Vagusreizung (25 mA 0,5 msec, 20 Hz, 15 sec)

Läßt man *Hexamethonium* in einer Endkonzentration von 1 : 100 bis 200 000 einwirken (400—200 γ auf 40 cm³ Tyrode), so ist nach wenigen Minuten die indirekte Erregbarkeit stark abgeschwächt oder aufgehoben, während die direkte Erregbarkeit (Abb. 2 B) nur wenig beeinträchtigt ist und auch bei längerer Einwirkung des Hexamethoniums erhalten bleibt. — Wie die direkte Reizung so bleibt auch Acetylcholin nach einer Hexamethoniumdosis, die den Vaguseffekt fast aufhebt, wirksam (Abb. 3 A). Die Hemmung der indirekten Erregbarkeit durch

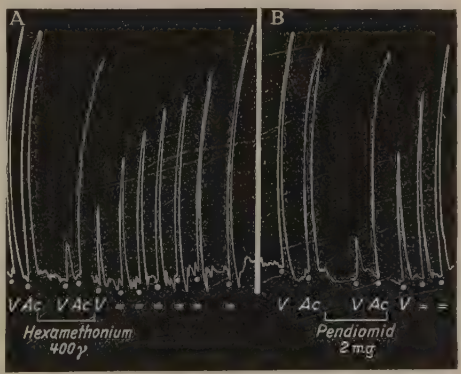


Abb. 3. Vergleich der Wirkung von Hexamethonium und Pendiomid. *V* Vagusreizung (18 mA, 1 msec, 20 Hz, 15 sec). Ac 10 γ Acetylcholin. Alle 2 min Badwechsel und elektrische Reizung. Die Wirkung des Hexamethoniums ist nach 15 min, diejenige des Pendiomids nach 7 min abgeklungen

Hexamethonium ist reversibel: nach mehrmaligem Badwechsel wird der Vagusreiz wieder voll wirksam.

Von dem vergleichsweise injizierten *Pendiomid* ist eine ungefähr 5fach höhere Dosis (2 mg) als von Hexamethonium (400 γ) erforderlich, um eine gleich starke Hemmung der vagalen Erregbarkeit zu verursachen (Abb. 3 B). Die Pendiomidwirkung ist leichter auswaschbar als diejenige des Hexamethoniums; schon nach 7 min ist in dem abgebildeten Versuch die Hemmungswirkung abgeklungen. — Gleiche Hemmungseffekte ließen sich mit *Penthonium* (200—400 γ) und *Tubocurarinchlorid* (1 bis 2 mg) erzielen.

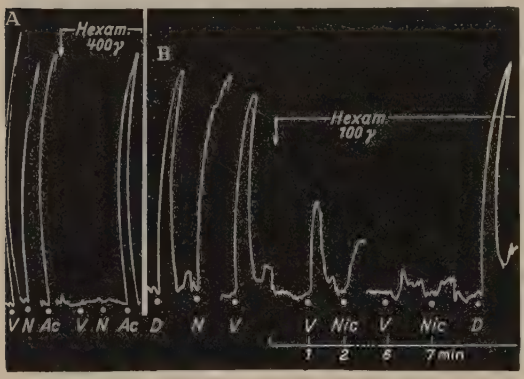


Abb. 4. Hexamethonium blockiert in gleichem Maße die Wirkung des elektrischen Vagusreizes und die Erregungswirkung des Nicotins. Nic 200 γ Nicotintartrat, *D* direkte elektrische Reizung (80 mA, 5 msec, 20 Hz, 20 sec), *V* elektrische Vagusreizung (25 mA, 0,5 msec, 20 Hz, 20 sec) Hexam. Hexamethonium. Badwechsel nach jeder Nicotingabe und gegebenenfalls erneuter Zusatz von Hexamethonium

Die Abb. 4 A zeigt, daß 400 γ Hexamethonium, die den Vagusreiz unwirksam machen, auch die Nicotinerregung verhindern. Eine kleinere Dosis Hexamethonium (100 γ) schwächt beide Wirkungen in gleichem Maße ab (Abb. 4 B). Die nicotinolytische Wirkung des Hexamethoniums geht somit seiner Hemmungswirkung auf die präganglionäre Erregbarkeit parallel. Die Acetylcholinwirkung und die direkte elektrische Erregbarkeit bleiben erhalten.

2. Atropin

Atropin hemmt in gleichem Maße die direkte wie die indirekte Erregbarkeit. Eine Atropindosis, durch die die Acetylcholinerregung *sofort* aufgehoben wird, schwächt die Wirkung des Vagusreizes zunächst nur ab, so daß der Eindruck einer gewissen Atropinresistenz entsteht. Nach etwas längerer Einwirkung — im Versuch der Abb. 5 nach 12 min — kommt es dann aber auch zur vollständigen Aufhebung der *elektrischen* Erregbarkeit, und zwar nicht nur bei indirekter-vagaler, sondern auch bei direkter Reizung. Auch jetzt spricht das Präparat noch unvermindert auf Barium und Histamin an. Da somit die Reaktionsfähigkeit der glatten Muskulatur durch Atropin nicht beeinträchtigt ist, kann an der Erregungswirkung des direkten elektrischen Reizes eine Erregung der Muskulatur selbst nicht maßgeblich beteiligt sein. Die Atropinempfindlichkeit der direkten Erregung spricht vielmehr dafür, daß in dieser

Versuchsanordnung auch bei direkter Reizung vorwiegend parasympathische Endstrukturen betroffen sind. Die Reizintensität reicht offenbar nicht aus, um die glatte Muskulatur selbst zu erregen. Die Atropinhemmung ist reversibel; nach mehrfachem Auswaschen werden Vagusreiz, direkter Reiz und Acetylcholin wieder wirksam.

Auch die *Nicotinerregung* läßt sich am Vagus-Magenpräparat durch Atropin verhindern. Sie ist aber ähnlich wie die Erregungswirkung des Vagusreizes weniger atropinempfindlich als die Erregungswirkung des von außen zugesetzten Acetylcholins,

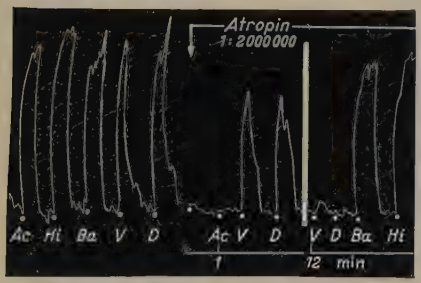


Abb. 5. Die Wirkung von Atropin (vgl. Text). *D* direkte Reizung (80 mA, 5 msec, 20 Hz, 15 sec), *V* Vagusreizung (15 mA, 0,5 msec, 20 Hz, 15 sec). Ac 20 γ Acetylcholin, Hi 40 γ Histamin, Ba20 mg Bariumchlorid

Abb. 6. Einfluß des Atropins auf die Erregungswirkung des Acetylcholins, Nicotins und Vagusreizes. *V* Vagusreizung (17 mA, 0,5 msec, 20 Hz, 15 sec), N 200 γ Nicotintartrat, Ac 12 γ Acetylcholin. Badwechsel nach jeder Injektion

indem sie wie die Vaguswirkung erst nach längerer Einwirkungszeit aufgehoben wird (Abb. 6). Die Empfindlichkeit der Nicotinerregung gegen Hexamethonium und Atropin, sowie die Latenz der Atropinwirkung sprechen dafür, daß der Nicotinwirkung eine ganglionäre Erregung zugrunde liegt, die sich cholinergisch auswirkt (Freisetzung von Acetylcholin).

Im Zusammenhang hiermit ist die Frage von Interesse, die vor kurzem auch von Busse, Wolf u. Lendle in Untersuchungen über die pharmakologische Beeinflussung des Peristaltikreflexes behandelt wurde: ob die darm*hemmende* Wirkung großer Nicotindosen durch eine Lähmung vegetativer Ganglien bedingt ist oder eine direkte Muskelwirkung darstellt. Läßt man auf das Vagus-Magenpräparat eine hohe Nicotindosis (400 γ) einwirken, so kommt es nach anfänglicher Erregung zu einer Erschlaffung. Der Vagusreiz ist jetzt unwirksam, während der direkte elektrische Reiz auch nach längerer Einwirkung des Nicotins noch unvermindert wirksam ist (Abb. 7). Die von dem direkten Reiz betroffenen postganglionären — cholinergischen — Strukturen und die glatte Muskulatur selbst sind demnach auch nach der hohen Nicotindosis noch erregbar. Erst Atropin macht auch den direkten elektrischen Reiz unwirksam (Abb. 7).

Die Beobachtung Richters, daß am Darm Barium nach höheren Nicotindosen unwirksam ist, dürfte ihre Erklärung darin finden, daß für die von ihm angewandten kleineren Bariumdosen nach Feldberg ein ganglionärer Angriffspunkt anzunehmen ist.

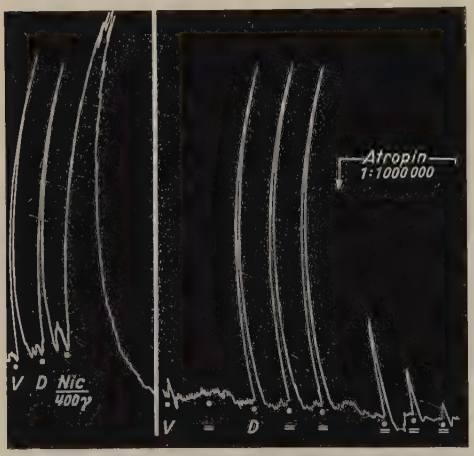


Abb. 7. Nicotin hemmt bei höherer Dosierung und längerer Einwirkung die indirekte, nicht die direkte Erregbarkeit. Diese wird erst durch Atropin aufgehoben. *D* direkte Reizung (80 mA, 4 msec, 20 Hz, 15 sec), *V* elektrische Vagusreizung (15 mA, 0,5 msec, 20 Hz, 15 sec). (Die Einwirkungszeit des Nicotins bis zur 2. Vagusreizung betrug 20 min)

3. Hemmungswirkungen bei direkter elektrischer Reizung

In einer Reihe von Versuchen hob Atropin die Erregungswirkung des elektrischen Reizes nicht nur auf, sondern kehrte sie um, so daß dieser jetzt eine reine Hemmung mit Tonusverlust verursachte (Abb. 8). Diese *Hemmung* bei direkter elektrischer Reizung trat regelmäßig auf, wenn das atropinisierte Präparat vorher mit Histamin oder Bariumchlorid tonisiert worden war. Sie ließ sich durch Sympathicolytica, z. B. Opilon und Dihydroergotamin abschwächen oder verhindern.

In Abb. 9 wird an einem mit Bariumchlorid tonisierten — atropinisierten — Präparat die Hemmungswirkung der direkten elektrischen Erregung mit derjenigen des Adrenalins verglichen. Ebenso wie die *erregende* Wirkung des Acetylcholins durch *Atropin* schneller aufgehoben wird als die elektrische Erregung (vgl. Abb. 5 und 6),

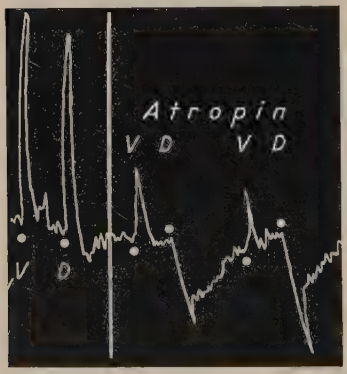


Abb. 8. Hemmungswirkungen des direkten elektrischen Reizes am atropinisierten Präparat (Atropin 1 : 4000000). *D* direkte Reizung (80 mA, 2 msec, 20 Hz, 1 5 sec), *V* Vagusreizung (10 mA, 0,5 msec, 20 Hz, 15 sec)

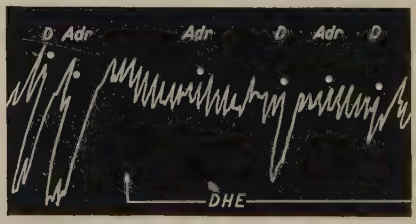


Abb. 9. Dihydroergotamin hebt die Wirkung des Adrenalins früher auf als die inhibitorische Wirkung der direkten elektrischen Reizung. Die Tyrodelösung enthält Atropin (1 : 2000000) und Bariumchlorid (1 : 8000). *D* direkte Reizung (100 mA, 10 msec, 20 Hz, 20 sec), DHE Dihydroergotamin (1:200000)

wird die *hemmende* Wirkung des Adrenalins durch *Dihydroergotamin* schneller aufgehoben als die Hemmungswirkung des elektrischen Reizes.

Durch *Ganglienblocker* (Hexamethonium und Pendiomid) ließ sich im Gegensatz zu den untersuchten *Sympathicolyticis* die inhibitorische Wirkung des direkten elektrischen Reizes nicht aufheben, wohl aber abschwächen. Auf die Bedeutung dieses Unterschiedes wird in der Besprechung eingegangen.

Bemerkungen zu den Versuchsergebnissen

1. Die bei elektrischer *Vagusreizung* auftretende Magenkontraktion läßt sich sowohl durch Ganglienblocker als durch Atropin aufheben, die bei *direkter* Reizung erfolgende Kontraktion hingegen nur durch Atropin. Im ersten Fall handelt es sich um eine präganglionäre Reizung, im zweiten Fall offensichtlich um eine Reizung postganglionärer cholinergischer Strukturen. Das Vagus-Magenpräparat ist deshalb geeignet zum Nachweis und zur Austestung ganglionär-blockierender Stoffe, vorausgesetzt, daß diese nicht — wie z. B. Buscopan — neben der ganglionären eine atropinartige parasympathicolytische Wirkung besitzen. Buscopan hebt die Wirkung sowohl des Vagusreizes als auch diejenige des direkten Reizes bzw. des Acetylcholins auf. Die Austestung am isolierten Magenpräparat hat gegenüber Versuchen in situ — z. B. Nickhaut der Katze. Herz- und Blutdruckwirkung bei elektrischer Reizung des Halsvagus — den Vorteil, daß die Effekte leicht auswaschbar sind und deshalb über mehrere Stunden hin vergleichende Untersuchungen durchgeführt werden können.

In der *Anti-Nicotinwirkung*, die bestimmte Pharmaka, z. B. Hexamethonium, Pendiomid und Curare sowie manche Lokalanaesthetica am isolierten *Darm* ausüben, wird in zahlreichen Arbeiten der letzten Jahre (Feldberg u. Lin; Ambache; Kronenberg; Greeff, Holtz u. Richter) ein Kriterium für eine diesen Stoffen zukommende ganglionärblockierende Wirksamkeit erblickt. Das wäre aber nur dann statthaft, wenn man sich vorher vergewissert hätte, daß der nicotinolytischen Wirkung eine *spezifische* Blockierung der präganglionären Reizung, d. h. der ganglionären Erregbarkeit entspricht. Denn es wäre zumindest denkbar, daß der Antinicotinwirkung eines Stoffes kein *funktioneller* Antagonismus im Bereich der ganglionären Erregungsübertragung, sondern beispielsweise nur eine *kompetitive* Verdrängungsreaktion zugrunde läge. Das Vagus-Magenpräparat erlaubt die Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten.

2. Die *Atropinempfindlichkeit* der *direkten* elektrischen Erregung steht im Einklang mit den Befunden Munros, daß Atropin am isolierten *Darm* eine durch direkte elektrische Reizung verursachte Erregung verhindert. Wir können diesen Befund insofern bestätigen, als auch wir in Versuchen

am isolierten Kaninchendarm fanden, daß bei direkter Reizung mit *niedriger* Intensität (30—50 mA) die Kontraktion sich durch Atropin aufheben ließ, bei *höherer* Reizintensität (100 mA) hingegen nicht. Es scheint demnach eine Frage der Reizintensität in Abhängigkeit von der Größe und Lage der Elektroden, sowie von der Art des Organs zu sein, ob neben den empfindlicheren cholinergischen Strukturen auch die Muskulatur selbst betroffen wird.

3. An Magenpräparaten mit hohem Eigentonus oder bei Tonisierung mit Histamin bzw. Barium wird die Erregungswirkung des direkten elektrischen Reizes durch Atropin nicht nur aufgehoben, sondern in eine Hemmungswirkung umgekehrt. Das findet eine Parallele in Versuchsergebnissen, die Ambache am isolierten *Darm* erhielt: am Kaninchendarm, dessen cholinergische Nerven durch Vorbehandlung mit Botulinustoxin ausgeschaltet waren, und am atropinisierten Hühnerdarm wirkte eine sonst erregende Nicotindosis rein hemmend. Hexamethonium verhinderte diese Hemmungswirkung. Ambache schloß aus seinen Befunden auf das Vorhandensein *intramuraler sympathischer Darmganglien*, die durch Nicotin erregbar und durch Hexamethonium blockierbar sind. Demgegenüber wird in unseren Versuchen die bei direkter elektrischer Reizung am Magenpräparat auftretende Hemmung durch Ganglienblocker nur *abgeschwächt* und erst durch Sympathicolytica *aufgehoben*. Der Hemmungswirkung des direkten elektrischen Reizes scheint demnach nicht nur eine Stimulierung der von Ambache postulierten intramuralen ganglionären, sondern auch eine Stimulierung postganglionärer adrenergischer Elemente zugrunde zu liegen.

Eine Hemmungswirkung am isolierten *Darm* läßt sich auch durch *periarterielle* elektrische Reizung erzielen, wie schon aus älteren Untersuchungen bekannt ist (McSwiney u. Robson, Finkelmann). Diese wird nach eigenen Beobachtungen — ebenso wie die Hemmungswirkung einer elektrischen Reizung der vom Plexus coeliacus zum Magen verlaufenden Nerven — durch Ganglienblocker nicht beeinflußt, wohl aber durch Sympathicolytica. In beiden Fällen handelt es sich also um die Erregung einer postganglionären sympathischen Nervenfaser. Für die durch direkte elektrische Reizung oder auch durch Nicotin erregbaren intramuralen sympathischen Ganglien wäre zu folgern, daß sie keine synaptischen Umschaltstellen einer sympathischen „*extrinsic*" Innervation des Magen-Darmtraktes darstellen, sondern einer autonomen sympathischen „intrinsic" Innervation angehören.

4. Die *Atropinempfindlichkeit* des Vagusreizes am Vagus-Magenpräparat steht in einem gewissen Gegensatz zu der angeblichen *Atropinresistenz* des Vagusreizes am Darm in situ, die sogar zu der Annahme eines von Acetylcholin verschiedenen, atropinresistenten Überträgerstoffes geführt hat (Übersicht bei Vaughan Williams). Diese Diskrepanz

könnte ihre Erklärung vielleicht darin finden, daß die Erregungswirkung injizierten bzw. der Badflüssigkeit zugesetzten Acetylcholins leichter und schneller durch Atropin aufgehoben wird als die Wirkung des bei elektrischer Vagusreizung freiwerdenden Acetylcholins. Für eine Identität des Überträgerstoffes mit Acetylcholin sprechen auch die Ergebnisse von Untersuchungen über die humorale Übertragung der vagalen Erregung am isolierten Vagus-Magenpräparat, über die in einer folgenden Arbeit berichtet wird.

Summary

1. A preparation of the isolated stomach and vagus of the guinea-pig is described which reacts to direct and indirect electrical stimulation with consistent contractions during several hours.

2. *Pharmacological* investigations on this preparation had the following results:

a) *ganglionic blocking drugs* (hexamethonium, Pendiomid et al.) abolished the contractions produced by nicotine and vagal stimulation, whereas those produced by direct electrical stimulation, acetylcholine, histamine and barium remained intact.

b) *Atropine* abolished the effect of nicotine and vagal stimulation as well as the effect of direct electrical stimulation. However, this paralysing action appeared only after a considerably longer presence of atropine in the bath than was necessary to abolish acetylcholine contractions.

3. In the presence of atropine inhibitory effects were seen on direct electrical stimulation. They were somewhat *reduced* by ganglionic blocking drugs, but could be *abolished* by sympatholytic drugs.

Literatur

Ambache, N.: J. of Physiol. **110**, 164 (1949). — Busse, W., J. Wolf u. L. Lendle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 177 (1953). — Feldberg, W., and C. J. Lin: Brit. J. Pharmacol. **4**, 33 (1949). — Feldberg, W.: J. of Physiol. **113**, 483 (1951). — Finkelmann, B.: J. Physiol. **70**, 145 (1930). — Greeff, K., P. Holtz u. W. Richter: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 167 (1952). — Kroneberg, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 215 (1954). — Magnus, R.: Erg. Physiol. **7**, 27 (1908). — McSwiney, B. M., and J. M. Robson: J. of Physiol. **71**, 194 (1931). — Munro, A. F.: J. of Physiol. **120**, 41 (1953). — Richter, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **193**, 281 (1939). — Vaughan Williams, E. M.: Pharmacol. Rev. **6**, 159 (1954).

Prof. Dr. P. Holtz und Dr. K. Greeff,
Frankfurt/Main, Pharmakologisches Institut, Ludwig-Rehn-Str. 14

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 436—443 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Über die Wirkung des Strophanthins auf die renale Kalium- und Natriumausscheidung bei Ratten*

Von
H. Bode und K. Greeff

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. November 1955)

Die in der Literatur sich findenden Angaben über die Wirkung des Strophanthins und anderer herzwirksamer Glykoside auf den Elektrolythaushalt sind widerspruchsvoll. Es wird sowohl über Steigerungen (z. B. Hotovy u. König, O'Brien) als über Senkungen des Kaliumspiegels des Serums berichtet (Zwemer u. Loewenstein, Varga u. a.). Wir selbst (Greeff u. Westermann) fanden in einer früheren Arbeit, daß nach hohen Strophanthindosen bei Ratten der Kaliumgehalt des Serums ansteigt und der Natriumgehalt absinkt. Die im quergestreiften Muskel sich abspielenden spiegelbildlichen Elektrolytverschiebungen — Abnahme des Kalium- und Zunahme des Natriumgehaltes — brachten wir in ursächlichen Zusammenhang mit den nach diesen hohen Strophanthindosen auftretenden Lähmungserscheinungen. Es erschien von Interesse zu untersuchen, ob und in welcher Weise sich die im Serum und Muskel auftretenden Änderungen des Elektrolytgehaltes auf die *renale Ausscheidung* auswirken. Es durfte vielleicht damit gerechnet werden, daß auch die Wirkung kleiner Strophanthindosen, durch die die Kalium- und Natriumwerte des *Serums* nicht nachweisbar verändert werden, im *Harn* faßbar würde. Neben Versuchen mit k-Strophanthin und k-Strophanthidin wurden Versuche mit g-Strophanthin, Scillaren und Convallatoxin durchgeführt.

Methodik

Gruppen von je 4 Ratten (140—200 g) wurden in Diuresekäfigen zusammengesetzt. Die Tiere erhielten 2 Tage vor dem Versuch als Standardkost Rattenfutter der Fa. Latz (Euskirchen) oder Kartoffelbrei, Wasser ad libitum. Da der Na-Gehalt der Kartoffeln nur etwa 4 mg% betrug — bei einem K-Gehalt von etwa 400 mg% —, wurde in einem Teil der Versuche Natriumchlorid (5,8 g/kg Kartoffelbrei) zugesetzt, so daß ein Na-Gehalt von 200 mg% resultierte. Trotz einheitlicher Ernährung kann

* Ein Teil der Ergebnisse wurde für die Dr.-Dissertation von H. Bode verwandt.

die K- und Na-Ausscheidung von Gruppe zu Gruppe sowie an verschiedenen Versuchstagen sehr verschieden sein. Wir haben deshalb vor jedem Versuch bei sämtlichen Tiergruppen eine Vorwässerung mit 2 cm³ Aqua dest./100 g Körpergewicht vorgenommen und die Elektrolytausscheidung in den darauf folgenden 2 Std kontrolliert. Nur bei guter Übereinstimmung der Ausscheidungswerte während dieser Kontrollperiode wurden die Versuche verwertet. Im Anschluß an die 2stündige Vorperiode wurde den *Versuchs*tieren 0,1—0,2 cm³/100 g einer wäßrigen Strophanthinlösung, den *Kontroll*tieren die entsprechende Menge Aqua dest. subcutan injiziert. 10 min später erhielten alle Tiere wiederum 2 cm³/100 g Aqua dest. mit der Schlundsonde — in länger dauernden Versuchen wiederholt alle 2 Std. Die K- und Na-Bestimmungen erfolgten flammenphotometrisch. Die Ergebnisse stützen sich auf Versuche an 141 Gruppen von je 4 Tieren. Die Tiere wurden frühestens nach 10 Tagen erneut zum Versuch verwandt.

Zur Kalium- und Natriumbestimmung im *Serum* wurden die Tiere durch Dekapitation getötet. Das abfließende Blut wurde nach der Gerinnung zentrifugiert. 0,2 cm³ des überstehenden Serums wurden für die K-Bestimmung 1 : 10, für die Na-Bestimmung 1 : 50 mit Aqua dest. verdünnt.

k-Strophantin und k-Strophanthidin wurden uns von der Fa. C. F. Boehringer u. Söhne, Mannheim, g-Strophanthin von der Fa. Kalichemie A. G., Hannover, zur Verfügung gestellt. Außerdem benutzten wir Convallatoxin der Fa. Gödecke & Co., Berlin, und Scillaren der Sandoz A. G., Nürnberg.

1. Die Wirkung von Strophanthin auf die renale Ausscheidung in Abhängigkeit von der Dosierung

In dem an 5 Tiergruppen zu je 4 Ratten vorgenommenen Versuch der Tab. 1 zeigten die während der 2-stündigen Vorperiode ausgeschiedenen Harnvolumina sowie die ausgeschiedenen K- und Na-Mengen bei den einzelnen Gruppen nur geringfügige Unterschiede. Nach 2 Std erhielten — wie in der Methodik beschrieben — sämtliche Tiere wiederum 2 cm³/100 g Aqua dest. peroral, nachdem den beiden *Kontrollgruppen* (1 und 2) je 0,1 cm³ Aqua dest., den *Versuchsgruppen* (3—5) 50, 100 und 200 γ/100 g k-Strophanthin in 0,1 cm³ subcutan injiziert worden waren.

Tabelle. 1. *Die Wirkung verschiedener Strophanthindosen auf die renale Kalium- und Natriumausscheidung.* 5 Gruppen von je 4 Ratten. Zu Beginn der Vorperiode und der Versuchsperiode erhielten die Tiere 2 cm³/100 g aqua dest. peroral. H. V. = Harnvolumen

		Vorperiode (2 Stunden)			Versuchsperiode (2 Stunden)			
Nr.	Tiergewicht g	H. V. cm³	K mg	Na mg	subcutan	H.V. cm³	K mg	Na mg
1	645	13,5	39,5	0,45	aqua dest	16,0	19,7	0,34
2	640	12,7	24,0	0,52	aqua dest.	16,0	10,2	0,45
3	635	14,0	30,9	0,46	50 γ/100 g k-Stroph. .	20,6	87,0	0,66
4	655	15,0	35,0	0,67	100 γ/100 g k-Stroph. .	22,5	109,0	2,14
5	655	13,5	32,3	0,41	200 γ/100 g k-Stroph. .	18,0	123,0	1,15

Während bei den Kontrolltieren die Kalium- und Natriumausscheidung gegenüber der Vorperiode etwas vermindert ist, findet sich bei den strophanthinbehandelten Tieren in Abhängigkeit von der verabreichten Dosis eine deutliche Zunahme und zwar vorwiegend der Kaliumausscheidung. Die Natriumausscheidung ist nur bei den höheren Dosierungen (100 und 200 γ) merklich vermehrt.

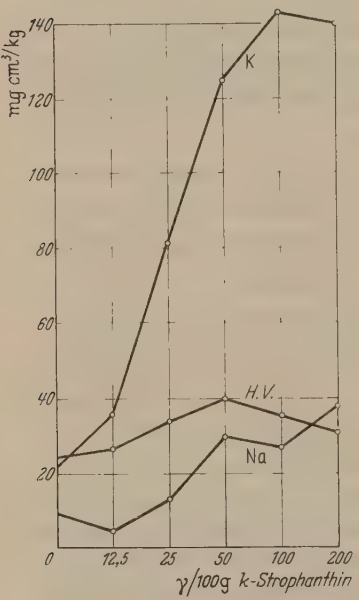


Abb. 1. *Dosisabhängige Wirkung von k-Strophanthin auf die renale Ausscheidung.* Mittelwerte zweier Gruppen von je 4 Ratten pro kg Körpergewicht. Versuchsdauer 2 Std. H. V. = Harnvolumen). (Na-reich ernährt; vgl. Methodik)

Die Abb. 1 zeigt, daß auch schon *kleinere* Strophanthindosen (12,5 und 25 γ/100 g) eine erhebliche Mehrausscheidung von Kalium verursachen, und daß wiederum erst bei *höheren* Dosen mit weiter vermehrter Kaliumausscheidung auch die Natriumwerte des Harns ansteigen. Bemerkenswert ist, daß das Harnvolumen im Bereich der mittleren Dosis (50γ/100g) erhöht ist und im Bereich der höheren Dosen (100—200 γ/100g) trotz besonders stark vermehrter K- und Na-Ausscheidung wieder abnimmt. Die Zunahme des Harnvolumens würde älteren Beobachtungen einer diuresesteigernden Wirkung des Strophanthins an anderen Tierarten — Hunden, Kaninchen und Katzen — entsprechen (Gremels, Jonescu u. Löwi, Kasztan). Eine von Lendle u. Oldenburg beschriebene diurese*hemmende* Wirkung höherer Strophanthindosen haben wir bei unserer Versuchsanordnung nicht beobachtet.

2. Zeitlicher Verlauf der Kalium- und Natriumausscheidung unter der Wirkung von Strophanthin

Die Abb. 2 stellt einen Versuch an insgesamt 32 Ratten dar, in dem die Diurese nach verschiedenen Strophanthindosen im Anschluß an eine 2stündige Vorperiode (siehe Methodik) über 6 Std verfolgt wurde. Bei den Kontrollgruppen liegen die ausgeschiedenen Harnvolumina während der ganzen Versuchszeit konstant ungefähr um 20% höher (24 cm³/kg) als die verabfolgten Wassermengen (20 cm³/kg alle 2 Std). Demgegenüber kommt es bei den Strophanthintieren in Abhängigkeit von der applizierten Dosis in den ersten 2 Std zu einer deutlichen Zunahme der Harnmengen, die dann konpensatorisch während der darauffolgenden 2—4 Std unter die Werte der Kontrollgruppen absinken. Die diuretische

Wirkung des Strophanthins ist offenbar nach 2 Std abgeklungen. Dem entspricht, daß auch das Maximum der K- und Na-Ausscheidung in die ersten 2 Std fällt.

Während nun im weiteren Verlauf des Versuches die *Kalium*ausscheidung der Strophanthintiere auf die Werte der Kontrolltiere absinkt,

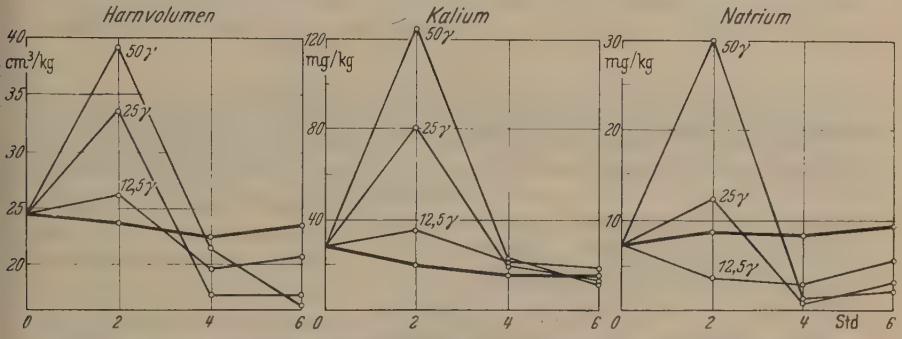


Abb. 2. *Die Wirkung des k-Strophanthins bei längerer Versuchsdauer* (vgl. Text). Mittelwerte zweier Gruppen von je 4 Ratten pro kg Körpergewicht. Dosierung: 12,5, 25 und 50 γ/100 g k-Strophanthin. (Na-reich ernährt; vgl. Methodik)

liegt die *Natrium*ausscheidung ähnlich wie die Wasserausscheidung deutlich unter der Norm. Die verminderte Na-Ausscheidung im späteren Verlaufe des Versuches dürfte bei den *höheren* Strophanthindosen (25—50 γ) wenigstens zum Teil durch die verminderte *Harn*sekretion bedingt sein, nicht aber bei der *kleinen* Dosis von 12,5 γ, da diese trotz etwas vermehrten Harnvolumens von Anfang an — d. h. schon während der ersten 2 Std-Periode — zu einer Verminderung der Na-Ausscheidung

Tabelle 2. *Steigerung der Kalium- und Verminderung der Natriumausscheidung durch 12,5 γ/100 g k-Strophanthin.* Einzelwerte aus Gruppen von je 4 Tieren. Versuchsdauer 4 Std mit zweimaliger peroraler Verabfolgung von je 2 cm³/100 g aqua dest. (Na-reich ernährt, vgl. Methodik)

	Harnvolumen cm³/kg		Kalium mg/kg		Natrium mg/kg	
	Kontr.	k-Stroph.	Kontr.	k-Stroph.	Kontr.	k-Stroph.
1	48,2	47,6	41,9	59,0	16,3	8,9
2	47,7	47,0	37,5	75,2	18,6	8,2
3	48,7	41,2	45,7	52,9	17,8	6,4
4	44,5	50,0	29,8	61,0	17,2	7,1
Mittelwert . .	47,3	46,4	38,7	62,0	17,5	7,7
Mittlerer Fehler des Mittelwertes	1,0	1,9	3,4	4,7	0,5	0,6
Differenz gegen Kontrollgr. %		−2		+60		−55

führt. Diese Wirkung kleiner Strophanthindosen — Verminderung der Na-Ausscheidung bei gleichzeitiger Erhöhung der K-Ausscheidung —, die auch in dem Versuch der Abb. 1 in Erscheinung tritt, ließ sich in einem weiteren Versuch an 32 Tieren, in dem die Ausscheidungswerte nach 4 Std bestimmt wurden, statistisch sichern (Tab. 2).

3. *Beziehungen zwischen renaler Ausscheidung und Elektrolytgehalt des Serums*

In der Einleitung haben wir auf die sich widersprechenden Angaben der Literatur in bezug auf die Beeinflussung des Kaliumgehaltes des Serums durch Strophanthin hingewiesen. Sowohl Steigerungen als Senkungen wurden beobachtet. Aus der Tab. 3 geht hervor, daß im kurzfristigen Versuch — 30 min nach der intravenösen Injektion — Strophanthin eine *Erhöhung* der Serum-Kaliumwerte hervorruft. Bei längerer Versuchsdauer — 8 Std — (Tab. 4) kommt es dagegen zu einer signifikanten *Abnahme* des Kaliumgehaltes im Serum. Auch der Natriumgehalt ist vermindert. Diesem *verminderten* Elektrolytgehalt des Serums entspricht eine *vermehrte* renale Ausscheidung während der 8stündigen Versuchszeit.

Tabelle 3. *Der Kaliumgehalt des Serums 30 min nach intravenöser Injektion von k-Strophanthin.* Mittelwerte von je 6 Tieren

Dosis	Kalium mg-%	Differenz geg. Kontr. %
Kontr. 0,1 cm³ aqua dest.	26,9	
25 γ/100 g	29,0	+ 8
100 γ/100 g	35,4	+32
150 γ/100 g	38,5	+43

Eine Bestätigung dieser Befunde ergab ein Versuch, in dem den Versuchstieren über 20 Std alle 2 Std 25 γ/100 g k-Strophanthin

Tabelle 4. *Der Kalium- und Natriumgehalt des Serums 8 Std nach 150 γ/100 g k-Strophanthin und die renale Ausscheidung während der 8stündigen Versuchsdauer* Mittelwerte von je 5 Tieren. Die Zahlen in Klammern bedeuten den mittleren Fehler des Mittelwertes

	Kontrolltiere (0,1 cm³ a. d./100 g)	k-Strophanthin 150 γ/100 g	Differenz gegenüber Kontrolltieren %
Serum			
Kalium . . . . . mg%	28,0 (0,76)	22,1 (0,51)	—21
Natrium . . . . . mg%	502 (19,1)	440 (20,2)	—12
renale Ausscheidung			
Harnvolumen . . . . . cm³	8,2	15,0	+ 83
Kalium . . . . . mg	10,8	67,8	+542
Natrium . . . . . mg	6,6	20,2	+230

subcutan verabfolgt wurden. Auch hier kam es zu einem signifikanten Absinken der Kalium- und Natriumwerte im Serum (Tab. 5).

Die Beeinflussung des Kaliumgehaltes des Serums durch Strophanthin im Sinne einer Vermehrung oder Verminderung hängt demnach von dem Zeitpunkt ab, zu dem die Bestimmungen vorgenommen werden; kurz nach der Injektion ist er erhöht, später ist er infolge der vermehrten renalen Ausscheidung vermindert

Tabelle 5. *Der Kalium- und Natriumgehalt des Serums nach mehrfachen Gaben, kleiner Strophanthindosen.* Je acht Ratten erhielten 20 Std lang alle 2 Std 25 γ/100 g insgesamt 250 γ/100 g k-Strophanthin bzw. 0,1 cm³ Aqua dest./100 g subcutan. K-, Na-Bestimmung 4 Stunden nach der letzten Injektion. In Klammern der mittlere Fehler des Mittelwertes

	Kontrolltiere aqua dest. 10×0,1 cm³/100 g	k-Strophanthin 10 × 25 γ/100 g	Differenz gegenüber Kontrolltieren %
Kalium . . . . . mg%	28,3 (1,09)	23,1 (0,45)	−18
Natrium . . . . . mg%	493 (15,5)	425 (15,3)	−14

4. Vergleichende Untersuchungen mit Strophanthidin, g-Strophanthin, Convallatoxin und Scillaren

Wie k-Strophanthin so bewirken auch die anderen untersuchten Glykoside eine Zunahme der renalen Elektrolytausscheidung. Es bestehen jedoch deutliche *quantitative* Unterschiede. Diese lassen sich am besten erfassen, wenn man die K-Ausscheidung als Kriterium der Wirkung nimmt (Abb. 3). *G-Strophanthin* ist deutlich weniger wirksam als k-Strophanthin. Das steht im Einklang mit der früheren Beobachtung (Greeff u. Westermann), daß auch die den Kaliumspiegel des Serums erhöhende und die muskellähmende Wirkung des g-Strophanthins schwächer ist. *Scillaren*, dessen diuretische Wirkung besonders stark sein soll, verursacht eine wesentlich geringere Kaliumausscheidung als k-Strophanthin. Auch die Wasserausscheidung ist nach Scillaren

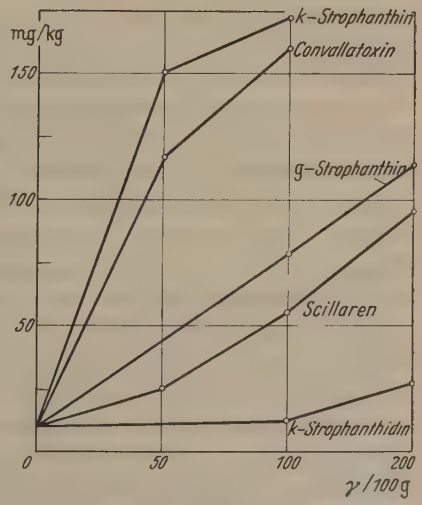


Abb. 3. *Vergleich der Wirkung von k-Strophanthin mit derjenigen anderer herzwirksamer Glykoside.* Mittelwerte zweier Gruppen von je 4 Ratten pro kg Körpergewicht. (Na-reich ernährt; vgl. Methodik)

geringer als nach k-Strophanthin. Eine fast gleich starke Wirkung wie k-Strophanthin besitzt dagegen *Convallatoxin*. — Ebenso wie die *Genine* eine schwächere *Herzwirksamkeit* besitzen als die Glykoside, so ist auch die *extracardiale* Wirkung auf den Elektrolythaushalt, wie sie in der vermehrten Kaliumausscheidung zum Ausdruck kommt, beim *k-Strophanthidin* (0,1 cm^3/100 g in 5% Alkohol enthaltender Lösung) unvergleichlich geringer als beim Glykosid (Abb. 3).

Bemerkungen zu den Versuchsergebnissen

Unsere Versuche haben ergeben, daß *extracardiale* Strophanthinwirkungen bei Ratten, die bisher nur nach *hohen* Dosen beobachtet wurden, auch schon bei relativ *niedriger* Dosierung an der renalen Elektrolytausscheidung nachweisbar werden.

In früheren Untersuchungen (Greeff u. Westermann) hatten wir gefunden, daß die nach Strophanthin zustande kommende Kali*aemie* im Verlaufe von 2 Std abklang. In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, daß die durch Strophanthin verursachte Kali*urie* ebenfalls in die beiden ersten Stunden nach der Injektion fällt. Die zeitliche Kongruenz zwischen Kali*aemie* und Kali*urie* macht einen kausalen Zusammenhang wahrscheinlich und die Annahme eines direkten Angriffspunktes dieser Strophanthinwirkung an der Niere vielleicht überflüssig. Dagegen spricht auch nicht, daß schon kleine Strophanthindosen, die noch keine nachweisbare Kaliaemie verursachen, zu einer vermehrten renalen Kaliumausscheidung führen. Ein unter der Nachweisbarkeitsgrenze liegender Einstrom von Kaliumionen ins Blut, z. B. aus der Muskulatur, deren Kaliumgehalt ja schon nach kleinen Strophanthindosen abnimmt, wird im Harn in Form einer vermehrten Ausscheidung faßbar.

Die nach hohen Strophanthindosen auftretende *Natrium*ausscheidung läßt sich jedoch nicht in gleicher Weise erklären. Der Natriumgehalt des Serums ist nicht erhöht, sondern erniedrigt. Diese Diskrepanz zwischen Abnahme im Serum und Zunahme im Harn könnte für eine Hemmung der tubulären Rückresorption sprechen, wie sie z. B. von Dörrie, Göltner u. Schwab angenommen wird. Da aber in nicht veröffentlichten Versuchen mit peroraler Verabfolgung von KCl die vermehrte Kaliumausscheidung in etwa gleichem Maße wie nach Strophanthin von einer vermehrten Natriumausscheidung begleitet war, wird es wahrscheinlich, daß die nach hohen Strophanthindosen vermehrte Natriumausscheidung nur eine Begleiterscheinung der Kaliurie ist.

Eine Hemmung der tubulären Rückresorption des Natriums ist vielleicht auch deshalb unwahrscheinlich, weil kleine Strophanthindosen, die eine nur geringfügige Mehrausscheidung von Kalium verursachen, zu einer *Abnahme* der Natriumausscheidung führen können. Diese dürfte wenigstens zum Teil durch die Einwanderung von Natrium in den nach

Strophanthin an Kalium verarmten Muskel verursacht sein. So würden sich die Wirkungen des Strophanthins auf die renale Elektrolytausscheidung auf seine „Gewebswirkung" zurückführen lassen, die im Bereich des quergestreiften Muskels in einem vermehrten Austritt von Kalium und einer Einwanderung von Natrium besteht (Greeff u. Westermann).

Am *epinephrektomierten* Tier und bei *Nebenniereninsuffizienz* ist bekanntlich der Kaliumspiegel des Blutes erhöht, der Natriumspiegel erniedrigt. Da Strophanthin auf Grund unserer Versuchsergebnisse in kleinen Dosen durch vermehrte Kaliumausscheidung den Kaliumgehalt des Serums erniedrigt und die Natriumausscheidung herabsetzt, müßte es in geeigneter Dosierung zu einer Normalisierung des bei Nebenniereninsuffizienz pathologisch veränderten Ionenmilieus im Blut beitragen können. Diese Strophanthinwirkung wäre derjenige des DOCA als eines Vertreters der sogenannten Mineralocorticoide oder auch des Alderosterons ähnlich und geeignet, die von Zwemer gemachte Beobachtung zu erklären, daß die Überlebenszeit nebennierenloser Tiere durch Strophanthin verlängert wird. Der zwischen Strophanthin und den Nebennierenrindenhormonen bestehenden Ähnlichkeit in bezug auf die Beeinflussung des Mineralhaushaltes entspricht die Ähnlichkeit der chemischen Konstitution als Sterinabkömmlinge. Es ist deshalb bemerkenswert, daß auch extracardiale Wirkungen des Aglukons — k-Strophanthidin — durch Verätherung mit Zucker zum Glykosid eine Steigerung erfahren.

Summary

1. In white rats *K-strophanthine* increases the renal excretion of potassium. The excretion of sodium is increased only with high doses (50 bis 200 μg/100 g); with lower doses (12,5 μg/100 g) it may be diminished.

2. *K-strophanthidine* has less influence on the excretion of potassium. — *G-strophanthine* (Oubain) and *Scillaren* have only about half the activity of k-strophanthine, whereas *Convallatoxin* is about equipotent.

Fräulein Gisela Thielecke danken wir für ihre Mitarbeit.

Literatur

Dörrie, H., E. Göltner u. M. Schwab: Klin. Wschr. **1954**, 165. — Greeff, K., u. E. Westermann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 103 (1955). — Gremels, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **130**, 61 (1928). Hotovy, R., u. W. König: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 177 (1951). — Jonescu, D., u. O. Loewi: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **59**, 71 (1908). — Kasztan, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **63**, 405 (1910). — Lendle, L., u. D. Oldenburg: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 243 (1950). — O'Brien, G. S., J. Rockey, Q. R. Murphy and W. J. Meek: Texas Rep. Biol. a. Med. **11**. 602 (1953); Ronas Ber. **170**, 84 (1954). — Varga, E., D. Bagdy u. L. Kesztyüs: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 29 (1949). — Zwemer, R. L., u. B. E. Loewenstein: Science (Lancaster, Pa.) **91**, 75 (1940).

Priv. Doz. Dr. K. Greeff,
Frankfurt/Main, Pharmakologisches Institut, Ludwig-Rehn-Str. 14

Arch exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 444—455 (1956)

Aus dem Tuberkulose-Forschungsinstitut Borstel, Institut für experimentelle Biologie und Medizin (Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Freerksen)

Autoradiographische Untersuchungen über die Lokalisation von $Na_2{}^{35}SO_4$ in der Meerschweinchenniere

Von

Friedrich-Otto Drenckhahn und Johannes Meissner

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen 13. August 1955)

Über die autoradiographische Lokalisation von Harnbildungs- und Stoffwechselprozessen in der Niere liegen bis jetzt nur wenige Ergebnisse vor.

Glimstedt u. Mitarbeiter (1952) fanden in vorläufigen Versuchen eine Anreicherung von ^{32}P in den Sammelrohrzellen. Oster u. Mitarbeiter (1955) zeigten in einer vorwiegend methodischen Arbeit markiertes Ortho- und Glycerophosphat in der Ratten- und Katzenniere. In der Kaninchenniere wurde anorganisches markiertes Phosphat von Ruf und Philipp (Philipp 1955) lokalisiert. Die Aufnahme von markiertem Sulfat in einigen Nagernieren untersuchten Odeblad u. Mitarbeiter (1952, 1955) im Hinblick auf den Stoffwechsel der sulfathaltigen Mucopolysaccharide. — Pressman u. Mitarbeiter (1950) bildeten mit ^{35}S, der zur Kennzeichnung von Antikörpern diente, die Glomeruli der Mäuseniere ab.

Die Anwendung der Autoradiographie beim Studium der Nierenfunktionen wird wohl vor allem durch methodische Schwierigkeiten bei der einwandfreien Darstellung der wasserlöslichen Plasma- bzw. Harnbestandteile behindert (Oster u. Mitarbeiter 1955), da bei verschiedenen Verfahren mit einer Auswaschung oder Dislokation dieser Stoffe zu rechnen ist. Mit der Autoradiographie als histochemischer Methode soll jedoch nicht nur die gesamte Aktivität der jeweils verfolgten Substanz im Nierenschnitt abgebildet werden. Gerade beim Studium tubulärer Prozesse ist es erforderlich, auch nach einem intracellulär gelegenen oder fixierten Anteil zu suchen, der sich durch verschiedene Vorbehandlung des Gewebes isoliert vom extracellulären Anteil dieser Substanz darstellen läßt. Dies könnte bei aktiven Transportvorgängen (Shannon 1939) erwartet werden, wenn die Substanz in der Zelle in chemisch veränderter oder in gebundener Form vorliegt. Hierbei können sich histologische und autoradiographische Methoden ergänzen und in gewissen Grenzen eine Darstellung einzelner aktiver Fraktionen des Gewebes ermöglichen.

Die autoradiographische Darstellung des Sulfats in der Niere ist besonders im Hinblick auf die Lokalisation tubulärer Leistungen von Interesse, da das Sulfat — wie auch das anorganische Phosphat — zu einer Gruppe von Substanzen gehört, die aktiv von den Tubuluszellen reabsorbiert werden (Zusammenfassung bei Wirz 1954). Die weiche β-Strahlung des ^{35}S begünstigt außerdem die genaue Zuordnung der autoradiographischen Bilder zu den histologischen Strukturen.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde der radioaktive Sulfatschwefel in der Meerschweinchenniere nach parenteraler Applikation von $Na_2{}^{35}SO_4$ dargestellt. Einerseits wurde derjenige Teil der ^{35}S-Aktivität in der Niere lokalisiert, der auch nach der histologischen bzw. autoradiographischen Vorbehandlung mit organischen Lösungsmitteln und Wasser nachweisbar bleibt. Dies ist also der Anteil des ^{35}S, der im Gewebe fixiert ist oder bei der histologischen Aufarbeitung in den Zellen niedergeschlagen wird. Andererseits wurde die gesamte Aktivität von trocken behandelten Nieren abgebildet.

Methodik

Der trägerfreie ^{35}S stand als Schwefelsäure in verdünnter HCl (p_H 3—5) zur Verfügung. Diese wurde mit Natronlauge neutralisiert und mit physiologischer Kochsalzlösung oder Wasser verdünnt. Die einzelne subcutan verabfolgte Dosis betrug 2,3 bis 2,6 mC/kg Meerschweinchen. Die Tiere wurden 5—7 Std, in einigen Fällen auch 24 Std nach der Injektion getötet. Die mit der Injektion verabfolgte Flüssigkeitsmenge betrugt 1,5—3 cm^3/kg. Die Nahrung der Tiere bestand gewöhnlich aus trockenem Heu und Hafer.

2 der hier angeführten 10 Meerschweinchen hatten eine experimentell hervorgerufene Staphylokokken-Infektion.

Die Meerschweinchen (zwischen 190 und 350 g Gewicht) wurden in kurzem Ätherrausch durch Entbluten aus den Carotiden getötet. Ein Tier starb spontan im Verlauf der Staphylokokken-Infektion. Die Nieren wurden sofort entnommen, nach verschiedenen Verfahren fixiert und eingebettet: 1. Fixierung in absolutem Alkohol und Paraffineinbettung über Benzol und Benzolparaffin. Bei einigen Nieren wurde zur Erleichterung der Entwässerung Methylbenzoat eingeschaltet. 2. Fixierung nach Carnoy und Paraffineinbettung wie unter 1). 3. Gefriertrocknung im Hochvakuum und Paraffineinbettung (Glick 1949). — Die Gewebsschnitte waren 15μ dick.

Von den mit Alkohol und Carnoyscher Flüssigkeit fixierten Schnitten wurden Strippingfilm-Autoradiographien* (Pelc, Doniach 1947, 1950) angefertigt. Die Belichtungszeit betrugt 3—8 Wochen. Von den durch Gefriertrocknung vorbereiteten Schnitten wurden zur Vermeidung jeglicher Flüssigkeitsberührung Kontakt-Autoradiographien hergestellt. Die dazu benötigte Filmplatte bestand auch aus Strippingfilmmaterial, das auf leere Objektträger aufgeklebt war. Film und Gewebsschnitt wurden durch eine Schraubzwinge gegeneinander gedrückt.

Die Zuordnung der Filmschwärzungen zu den histologischen Strukturen erfolgte durch Vergleich der Autoradiographien mit gewöhnlichen, gefärbten Nachbarschnitten. Einige Strippingfilmpräparate wurden auch direkt mit Hämalaun nach Mayer gefärbt.

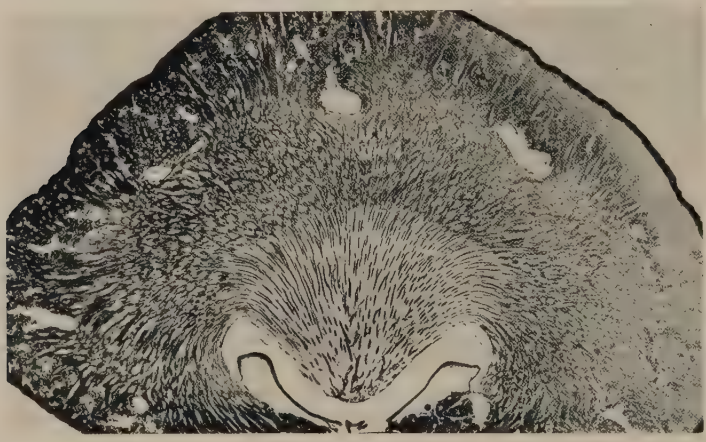
Ergebnisse

Der wesentliche autoradiographische Befund aller ^{35}S-aktiven Präparate besteht in strukturierten Filmschwärzungen im Bereich der Sammelrohre.

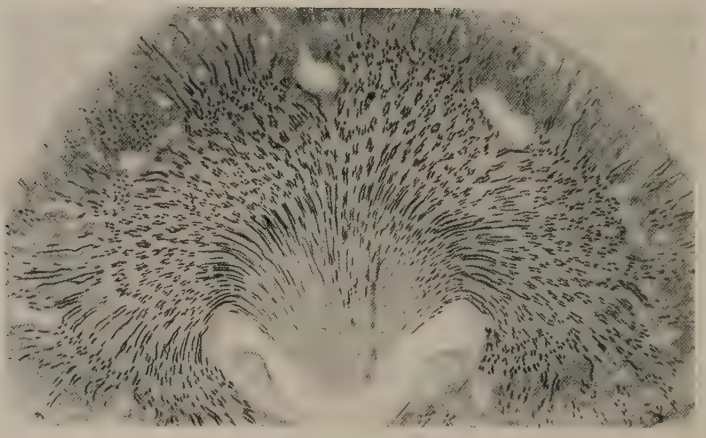
Abb. 1 zeigt die *Strippingfilm-Autoradiographie* eines mit Alkohol fixierten Nierenschnittes unter dem gefärbten Nachbarschnitt. Die

* Strippingfilmplatten der Firmen Ilford, London, und Kodak, London.

Fixierung nach Carnoy liefert prinzipiell gleiche Bilder. Im Bereich der *Innenzone des Marks* ist bereits in den Übersichtsbildern eine klare Zuordnung der Filmschwärzung zu den sich verzweigenden, großkalibrigen



a



b

Abb. 1. Meerschweinchenniere, 6 Std nach der Injektion von $Na_2{}^{35}SO_4$. Alkoholfixierung (×6). a) Kontrollschnitt, Azanfärbung. b) Strippingfilm-Autoradiographie des Nachbarschnittes, ungefärbt

Sammelrohren möglich. Im azangefärbten Vergleichspräparat treten die Sammelrohre deutlich hervor (Abb. 1a). Die Intensität der Filmschwärzungen ist im Bereich der Papillenspitze gewöhnlich gering. Sie nimmt rindenwärts zu und erreicht über den Sammelrohren der Außenzone ihren größten Wert.

In der *Außenzone des Marks* ist die Zuordnung der Schwärzung zum Kanälchensystem etwas schwieriger. Aus dem durch Lageskizzen unterstützten Vergleich der Autoradiographien mit den gefärbten Kontrollpräparaten und der Betrachtung gefärbter Autoradiographien bei stärkeren Vergrößerungen geht jedoch hervor, daß auch hier die Schwärzungen über den Sammelrohren liegen. Durch die besondere architektonische Eingliederung der Sammelrohre in die durch Gefäßbüschel gekennzeichnete Zone wird der Vergleich von Kontrollpräparat und Autoradiographie sehr erleichtert, sofern die Schnitte parallel zur Mark-Rindengrenze geführt sind. Bei dieser Schnittführung findet man die jeweils individuelle Gruppierung der Sammelrohre um das Gefäßbüschel, wie sie sich aus den Kontrollpräparaten bestimmen läßt, in der Anordnung der autoradiographischen Filmschwärzungen wieder (Abb. 2). — Entsprechend den Gabelungen des Sammelrohrsystems sieht man unter den Filmschwärzungen auch einige Verzweigungsbilder. In Abb. 3 ist die Verzweigung eines Sammelrohres an der Mark-Rindengrenze zu erkennen. Es handelt sich hierbei wohl um eine tief gelegene Zusammenmündung aus dem Rindenbereich. — Besonders im Bereich der Außenzone läßt sich nicht vollständig ausschließen, daß die intensiven Schwärzungen auch zu einem geringen Teil über den gestreckten Kanälchen des Nephrons liegen. Die intensiven Schwärzungen wurden jedoch nur über den Sammelrohren beobachtet.

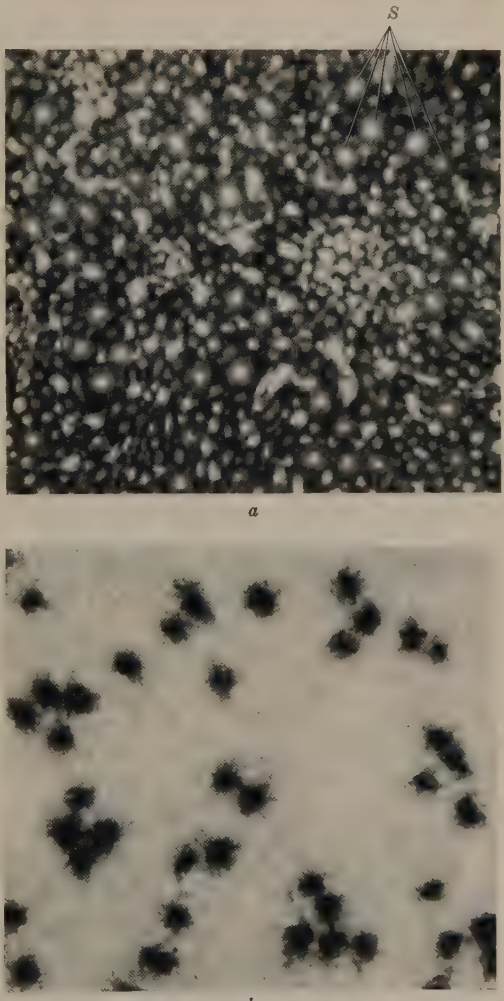


Abb. 2. Außenzone des Marks. CARNOY-Fixierung (× 120).
a) Vergleichspräparat, Azan. S: Sammelrohre.
b) Autoradiographie

Auch im Bereich der *Rinde* stellen sich die Sammelrohre dar. Die entsprechenden Filmschwärzungen treten bereits in den Übersichtspräparaten (Abb. 1) hervor.

In Abb. 4 ist ein Rindenabschnitt mit drei Markstrahlen vergrößert abgebildet. Im autoradiographischen Bild finden sich drei entsprechende Gruppen von Sammelrohren. Bei zwei Rohren ist eine Abzweigung zu erkennen. Die Anordnung der Markstrahlrohre tritt wieder im Querschnitt, parallel zur Nierenoberfläche hervor. Man sieht dann 6 bis 9 Sammelrohrschwärzungen an der Peripherie des Markstrahls. Abb. 5 zeigt dies an einer gefärbten Autoradiographie. Die Glomeruli sind durch die Kerndarstellung schwach zu erkennen. — Kapselwärts aufsteigende, im Rindenlabyrinth gelegene Sammelrohr-Arkaden rufen anscheinend keine Schwärzungen hervor.

Bei gleichem photographischen Prozeß sind die Filmschwärzungen über den einzelnen Sammelrohrabschnitten 24 Std nach der $Na_2{}^{35}SO_4$-Injektion erheblich schwächer als 7 Std danach. Zur Kontrolle wurden auch von den Nieren eines Meerschweinchens, welches keine ^{35}S-Injektion erhalten hatte, Autoradiographien angefertigt. In diesen Präparaten finden sich die Sammelrohrschwärzungen nicht.

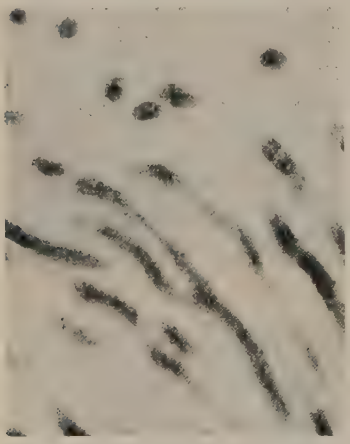


Abb. 3. Autoradiographie der Außenzone des Marks an der Mark-Rindengrenze. Alkoholfixierung (× 60)

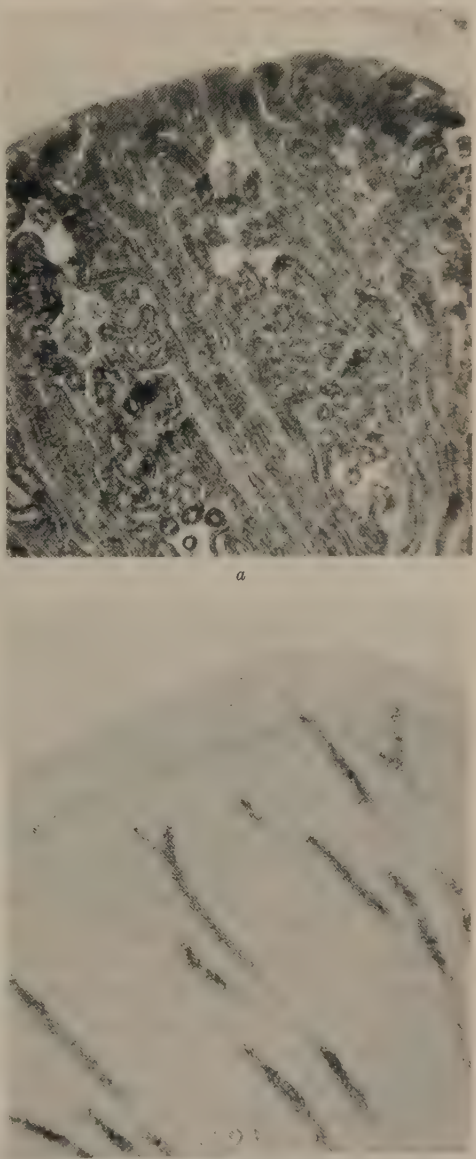
Bei der Alkoholfixierung sind die Schwärzungen intensiver als bei der Carnoy-Fixierung, wenn bei demselben Meerschweinchen die beiden Nieren unter gleichen photographischen Bedingungen in dieser Weise verglichen werden. Man muß daher annehmen, daß bei der Carnoy-Fixierung ein weiterer Teil des Schwefels, der den Schwärzungen über den Sammelrohren zugrunde liegt, herausgelöst wird. Ein Nachteil der Alkoholfixierung ist die stärkere Schrumpfung und teilweise Zerreißung des Gewebes, die zum einen die Güte der gefärbten Vergleichspräparate herabsetzt, zum anderen die radiographischen Schwärzungen kontrastreicher erscheinen läßt. Letzteres kommt dadurch zustande, daß sich der Strippingfilm den Unebenheiten des Präparates anschmiegt und dabei verzogen wird, so daß sich für die Betrachtung unterschiedlich dicke Schichten ergeben. — An den Unebenheiten der Präparate kann auch die diffuse Untergrundschwärzung scheinbare Schwärzungsstrukturen hervorrufen.

Im Gegensatz zum Sammelrohrsystem hebt sich das Nephron nur wenig oder gar nicht von der Untergrundschwärzung ab. Die diffuse Schwärzung, die in Abb. 1b vor allem in der Rindenregion zu erkennen ist, läßt sich nicht differenzieren. Sie ist auch nicht in allen Präparaten vorhanden, während die Schwärzung über den Sammelrohren immer auftritt.

Bei der genauen Lokalisierung der Schwärzungen ist zu entscheiden, ob die Darstellung der Sammelrohre durch intracelluläres ^{35}S hervorgerufen ist. In Abb. 6 ist von einer mit Hämalaun angefärbten Autoradiographie zum einen die Ebene der Filmschwärzungen, zum anderen die Ebene des Gewebeschnittes bei stärkerer Vergrößerung abgebildet. Für diese Bilder wurden Sammelrohre mit schwacher Filmschwärzung,

24 Std nach der $Na_2{}^{35}SO_4$-Injektion, ausgewählt. Man erkennt, daß die Filmkörner über den Zellen (Kerne) angereichert sind. Es ist außerdem zu berücksichtigen, daß die Nieren bei der histologischen Aufarbeitung ausgiebig mit einer Anzahl von organischen Lösungsmitteln durchspült werden, und die Schnitte bei der Strippingfilmmethode auch durch Wasser geführt werden. Die ^{35}S-Ansammlung im Bereich der Sammelrohre bleibt dabei bestehen, während das übrige Gewebe keine oder eine erheblich geringere Schwärzung hervorruft. Man kann hieraus und aus der Betrachtung der gefärbten Autoradiographien schließen, daß der Radioschwefel intracellulär gelegen ist.

Ein natürlicheres Bild der Aktivitätsverteilung in vivo erhält man in den *Kontaktfilm-Präparaten* der durch Gefriertrocknung aufgearbeiteten Nieren. Jegliche Berührung des Gewebes mit Lösungsmitteln ist hierbei vermieden. Das Auflösungsvermögen ist bei dieser Methode geringer als beim Strippingfilm. Es besteht jedoch auch hier eine intensive Filmschwärzung über den Sammelrohren des Marks und der Rinde, die sich ähnlich kontrastreich wie bei den Strippingfilmpräparaten von der schwächer geschwärzten Umgebung abhebt (Abb. 7). Die schwächere Schwärzung über dem Nephron läßt sich



a

b

Abb. 4. Nierenrinde. CARNOY (× 60). a) Kontrollpräparat. Azan. b) Autoradiographie

auch hier nicht weiter differenzieren. Aus diesen Bildern ist zu folgern, daß der Radioschwefel des Sulfats *selektiv* in den Sammelrohren *angereichert* wird.

Eine gewisse Dislokation löslicher Substanzen soll auch bei der Paraffineinbettung nach Gefriertrocknung eintreten (Oster u. Mitarbeiter 1955). Dies kann jedoch für den hier erhobenen Befund keine Bedeutung haben. Man muß eher daran denken, daß bei dieser histologischen Aufarbeitung das in den Kanälchenlumina befindliche Sulfat dort abgelagert wird und an den Schwärzungen wesentlich beteiligt sein könnte. Es ist aber unwahrscheinlich, daß nur die Sammelrohre in ihrem ganzen Verlauf — vor allem auch in der Rinde — eine hochkonzentrierte Sulfatlösung enthalten. Aus den Strippingfilmpräparaten geht gleichfalls hervor,

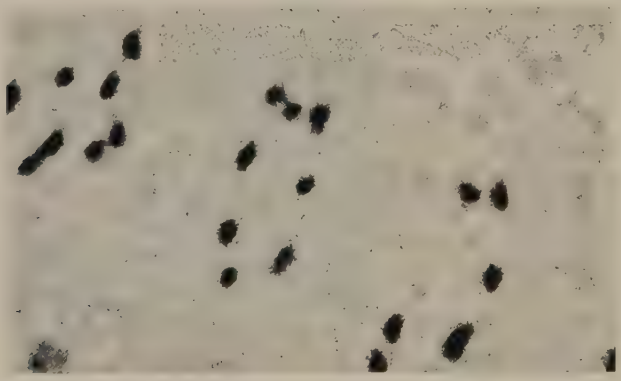


Abb. 5. Autoradiographie der Rinde, mit Hämalaun nachgefärbt. Alkohol (× 60)

daß der Sulfatschwefel intracellulär gelegen ist. — Mit der Erklärung der Schwärzungsbefunde in den Kontaktfilmpräparaten durch vorwiegend intracelluläres ^{35}S stimmt auch ein an der Kaninchenniere erhobener Befund überein, daß bei der $Na_2{}^{35}SO_4$-Ausscheidung die ^{35}S-Aktivitätskonzentration des Endharns immer kleiner ist als die des Nierengewebes.

Bei Berücksichtigung der Kontaktfilm- und Strippingfilmpräparate ergibt sich somit eine selektive, intracelluläre Anreicherung des ^{35}S in den Sammelrohrzellen. Der Sulfatschwefel muß dabei offenbar in irgendeiner Form fixiert sein, da er auch nach Vorbehandlung der Nierenschnitte mit Lösungsmitteln scharf umrissen über den histologischen Strukturen der Sammelrohre abgebildet wird.

Als Nebenbefund ist in diesem Zusammenhang die Anreicherung des Sulfatschwefels im Granulationsgewebe von Abscessen zu erwähnen. In der Verfolgung anderer Fragestellungen wurden beim Meerschweinchen durch intracardiale Injektion von Staphylococcus-aureus-Suspensionen Nierenabscesse hervorgerufen. Acht Tage nach dem Infektionsbeginn erhielten die Tiere zweimal im Abstand von 24 Std eine $Na_2{}^{35}SO_4$-Injektion in der bereits beschriebenen Weise und Dosierung und wurden dann 24 Std nach der zweiten Injektion getötet. Autoradiographisch zeigt sich

dann eine deutliche Filmschwärzung über dem Granulationswall von paranephritischen Abscessen. In Abb. 8 ist ein derartiger Absceß abgebildet. Man erkennt, daß die Schwärzung über dem Granulationsgewebe gelegen ist, welches die zellige Infiltration zum Nierenbecken hin abgrenzt. Das Sulfat wird demnach in irgendeiner Form vom Granulationsgewebe fixiert oder sogar angereichert. Dieser von uns autoradiographisch erhobene Befund entspricht den Ergebnissen von Layton (1950), die in vitro an Muskelwunden junger Hühner gewonnen wurden. In dem regenerierenden Gewebe dieser Wunden beobachtete er eine besondere Adsorption von Sulfat, das hier in unlöslicher Form fixiert wurde. Dieser Befund wird so gedeutet, daß Sulfat zum Aufbau von Intercellularsubstanzen bei der Wundheilung verwendet wird.

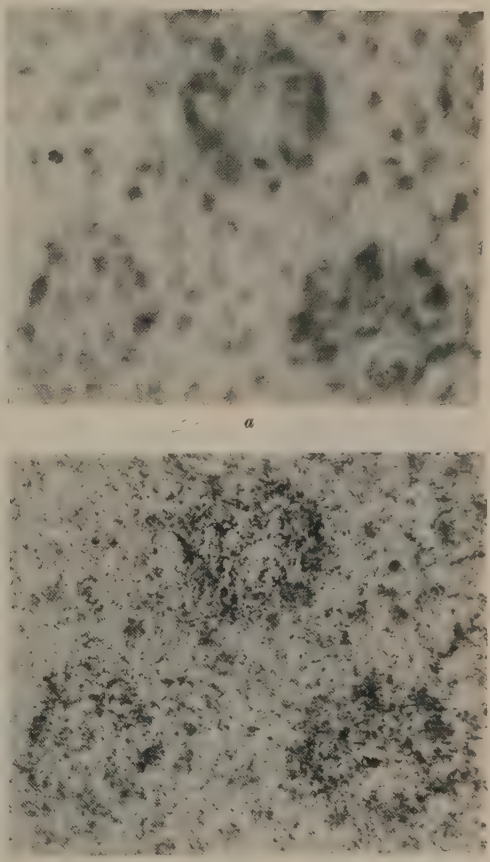


Abb. 6. Autoradiographie von Sammelrohren des Marks, mit Hämalaun nachgefärbt. Alkohol (× 520). a) Abbildung in der Ebene des Nierenschnittes. b) Abbildung in der Filmebene

Besprechung

Über den aktiven Anteil der Sammelrohre an der Harnbildung ist wenig bekannt. Auf Grund funktionell-histologischer und histochemischer Untersuchungen wird die Ansicht vertreten, daß die Sammelrohre aktiv an der Harnbildung teilnehmen (Glimstedt u. Mitarbeiter 1952). So soll das Chlorid durch einen aktiven Prozeß in den Sammelrohren des Marks angereichert und reabsorbiert werden (Glimstedt 1497/48, Ljungberg 1947). Auch eine Reabsorption anderer Elektrolyte als Natrium und Chlorid könnte hier erfolgen (Glimstedt u. Mitarbeiter 1952). Von diesen Untersuchern wird auch kurz darauf hingewiesen, daß autoradiographisch eine Anreicherung von ^{32}P zu beobachten ist.

Beim Passieren der Sammelrohre kann der Harn konzentriert werden (Vimtrup 1949). Nach neueren Vorstellungen erfolgt im Sammelrohrsystem des *Nierenmarks* die endgültige, summarische Harnkonzentrierung, die mit einem

mikrokryoskopisch nachgewiesenen Anstieg des osmotischen Druckes im Blut und in der Harnflüssigkeit aller Kanälchen zur Papillenspitze hin verbunden ist (Wirz, Hargitay, Kuhn 1951, 1951, 1953). An der Papillenspitze erreicht der osmotische Druck den Wert des Endharns. Die endgültige Konzentrierung kann dabei durch osmotischen Druckausgleich ohne aktive Leistung der Sammelrohrzellen erfolgen. In prinzipiell gleicher Weise steigt auch der osmotische Druck in den Markzellen der konzentrierenden Niere zur Papillenspitze hin an (Ullrich, Drenckhahn, Jarausch 1955, 1955). Diesem Druckanstieg, der bei Diuresen abgebaut wird, geht neben der Natriumkonzentration auch die Chlor- und Harnstoffkonzentration (Ullrich 1955) in den einzelnen Markebenen parallel.

Die Erhöhung des osmotischen Druckes im Mark während der summarischen Harnkonzentrierung muß auch bei der Deutung von Elektrolytverteilungen in diesem Nierenabschnitt berücksichtigt werden. In dieser Richtung sind daher diejenigen Anhäufungen von Elektrolyten im Nierenmark bzw. in den Sammelrohren zu überprüfen, aus denen auf spezielle aktive Leistungen dieses Kanälchenabschnittes bei der Harnbildung geschlossen wurde.

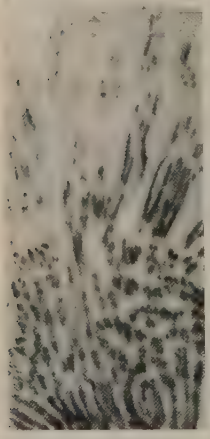


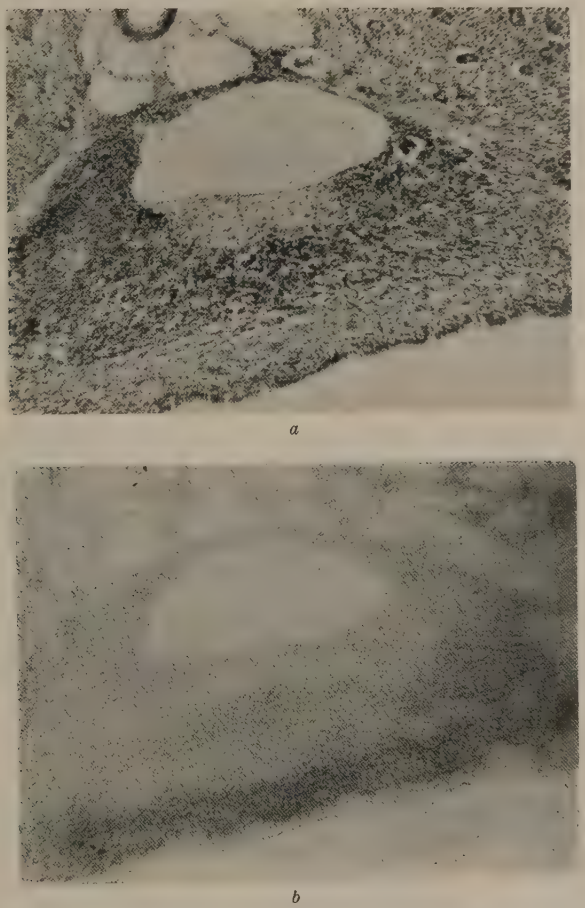
Abb. 7. Kontaktfilm-Autoradiographie der Niere. Gefriertrocknung (× 10)

Aus der vorliegenden Untersuchung über die Lokalisation von markiertem Sulfat in der Niere geht autoradiographisch unmittelbar hervor, daß nur in einem ganz bestimmten Kanälchenabschnitt, und zwar in den Sammelrohren im Bereich des Marks und der Rinde, eine selektive intracelluläre Anhäufung von Sulfatschwefel besteht, und daß ein dauernder Austausch dieses Schwefels stattfindet. Dieser Befund ist nur durch eine den Sammelrohrzellen eigene, aktive Tätigkeit zu erklären. Damit ist zunächst ganz allgemein eine „Funktion" der Sammelrohre gefunden, welche die bereits von anderer Seite geäußerte Auffassung unterbaut, daß den Sammelrohren differenziertere Leistungen als nur die eines ableitenden Röhrensystems zuzuschreiben sind.

Es ist anzunehmen, daß die Nieren der Meerschweinchen einen konzentrierten Urin produzierten. (Gefrierpunktsbestimmungen des Endharnes wurden nicht vorgenommen.) Ein Zusammenhang des Befundes mit der summarischen Harnkonzentrierung besteht jedoch offensichtlich nicht. Dagegen spricht auch, daß die ^{35}S-Anreicherung in Mark und Rinde beobachtet wird.

Es liegt nahe, in Anreicherung und Austausch des Sulfatschwefels in den Sammelrohren die tubuläre Komponente der Sulfatausscheidung zu sehen, wenn auch die Lokalisation außerhalb des Nephrons ungewöhnlich erscheint. Bei dieser tubulären Komponente handelt es sich nach heutiger Auffassung um einen Reabsorptionsprozeß, dem der größte Teil des filtrierten endogenen Sulfats unterworfen ist (Goudsmit u. Mitarbeiter 1939, Lotspeich 1947). Die Reabsorption erfolgt durch aktive Zell-Leistung und ist durch eine maximale Reabsorptionsrate

begrenzt. Die intracelluläre ^{35}S-Anhäufung ist dann der Ausdruck des tubulären Transportvorganges und dies bedeutet, daß erst am Ende des Harnbildungsvorganges die Rückresorption des Sulfates erfolgt, zu einem Teil, d. h. im Nierenmark, gemeinsam mit der endgültigen Konzentrierung des Harnes. Im Hinblick auf die gemeinsame Lokalisation von



a

b

Abb. 8. Staphylokokkenabsceß. Alkoholfixierung (×60). a) Vergleichspräparat, Methylenblaufärbung. b) Strippingfilm-Autoradiographie des Nachbarschnittes

Sulfatresorption und Harnkonzentrierung ist der beim Hund erhobene Befund bemerkenswert, daß bei osmotischer Kochsalzdiurese die Sulfatreabsorptionskapazität herabgesetzt ist (LOTSPEICH 1947). Dies ist anscheinend ein unspezifischer osmotischer Effekt, so daß LOTSPEICH die Vermutung diskutiert, daß Sulfat- und Wasserresorption durch den gleichen osmotischen Vorgang begrenzt werden.

Das Sulfat wird jedoch nicht nur als solches unverändert ausgeschieden. Aus Untersuchungen von Grabbe, (1928), Marquardt (1937) und vor allem von Dziewiatkowski (1949) geht hervor, daß es zu einem Teil zur Synthese veresterter Sulfate, die in erster Linie in Dünndarm und Leber zu lokalisieren ist, verwandt wird. Exogenes Sulfat erscheint daher auch in der Estersulfatfraktion des Urins. Sein Anteil ist bei gleichzeitiger Verabfolgung von Phenol erhöht. Über den Ausscheidungsmechanismus der Phenylsulfatester liegen Untersuchungen von Sperber (1949) vor. Er schließt aus Clearence-Messungen bei der Ziege, daß eine tubuläre Exkretion des Phenylsulfats erfolgt; auch beim Hühnchen wurde von Sperber eine Exkretion dieses Esters und einiger anderer Entgiftungsprodukte des Körpers gefunden. Die Ausscheidung von veresterten Sulfaten ist auch für den ^{35}S-Befund an der Meerschweinchenniere in Betracht zu ziehen. Ein einzelner Versuch, bei dem einem Meerschweinchen neben dem $Na_2{}^{35}SO_4$ auch Phenol verabfolgt wurde, änderte die autoradiographischen Schwärzungen nicht; hierdurch wird jedoch die Möglichkeit noch nicht ausgeschlossen, daß es sich um die Ausscheidung von Estersulfat handelt. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um diese Fragen zu klären.

Norhagen u. Odeblad (1955) untersuchten autoradiographisch die Aufnahme von ^{35}S-markiertem Sulfat in der Mäuse-, Ratten- und Kaninchen-Niere. Hierbei wurde eine besondere ^{35}S-Ansammlung in den Sammelrohrzellen — wie wir sie beim Meerschweinchen fanden — nicht beobachtet. Bei diesen Untersuchungen waren Methodik und Zielsetzung jedoch anders als bei uns. Dies betrifft zum einen die histologische Aufarbeitung und die Trägerdosis des Radiosulfats. Zum anderen lag bei ihren Beobachtungen, die sich auf einen Zeitraum von 6 Stunden bis 21 Tagen nach der Injektion erstreckten, das Hauptgewicht auf den längeren Zeiten. — Die von uns beobachtete Sammelrohrdarstellung besteht nur vorübergehend und ist bereits 24 Stunden nach der Injektion des Radiosulfats weitgehend abgeklungen.

Zusammenfassung

Nach subcutaner Injektion von $Na_2{}^{35}SO_4$ wurde der radioaktive Sulfatschwefel in den Nieren von Meerschweinchen autoradiographisch dargestellt. Hierbei wurden im wesentlichen zwei verschiedene Methoden angewandt. 1. Strippingfilm-Autoradiographie gewöhnlicher Paraffinschnitte. 2. Kontaktfilm-Autoradiographien unbehandelter Paraffinschnitte aus Nieren, die durch Gefriertrocknung fixiert waren.

Aus den autoradiographischen Befunden geht hervor, daß nur in einem ganz bestimmten Kanälchenabschnitt, und zwar in den Sammelrohren, eine selektive intracelluläre Anreicherung von Sulfatschwefel besteht. Im Bereich des Nephrons wurden keine charakteristischen ^{35}S-Verteilungen beobachtet.

Diese intracelluläre Anreicherung und der damit verbundene Austausch von Sulfatschwefel ist durch eine aktive Tätigkeit der

Sammelrohrzellen zu erklären. Damit wird die Auffassung unterstützt, daß die Sammelrohre eine differenziertere Funktion als nur die eines ableitenden Rohrsystems haben.

Als Nebenbefund ergab sich eine Fixierung oder auch Anreicherung von Sulfatschwefel im Granulationswall paranephritischer Abscesse.

Herr Dr. H. Kölbel, Borstel, hat uns freundlicherweise für die Abbildungen seine Erfahrungen in der Mikrophotographie zur Verfügung gestellt.

Literatur

Doniach, J., and S. R. Pelc: Brit. J. Radiol. **23**, 184 (1950). — Drenckhahn, F. O., u. K. J. Ullrich: Ber. Physiol. **172**, 114 (1955). — Dziewiatkowski, D. D.: J. of Biol. Chem. **178**, 389 (1949). — Glick, D.: Techniques of Histo- and Cytochemistry. New York 1949. — Glimstedt, G.: Bull. schweiz. Akad. Med. Wiss. **3**, 182 (1947/48). — Glimstedt, G., H. R. Johansson u. N. Jonsson: Verh. Anat. Ges. **50**, 182 (1952). — Goudsmit, A., M. H. Power and J. L. Bollman: Amer. J. Physiol. **125**, 506 (1939). — Grabbe, C.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **137**, 96 (1928). — Hargitay, B., W. Kuhn u. H. Wirz: Helvet. physiol. Acta **9**, C 26 (1951). — Layton, L. L.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **73**, 570 (1950). — Ljungberg, E.: Acta med. scand. (Stockh.), Suppl. **186** (1947). — Lotspeich, W. D.: Amer. J. Physiol. **151**, 311 (1947). —Marquardt, P.: Über die Veresterung von Phenolen im Darm. Inaug.-Diss. Berlin 1937. — Norhagen, Å., and E. Odeblad: Acta Pathol. et Microbiol. Scand. **36**, 224 (1955). — Odeblad, E., and H. Boström: Acta Pathol. et Microbiol. Scand. **31**, 339 (1952). — Oster, H., H. W. Kundt u. R. Taugner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 476 (1955). — Pelc, S. R.: Nature (Lond.) **160**, 749 (1947). — Philipp, K., in Fellinger-Vetter: Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung. München-Berlin 1955. — Pressman, D., H. N. Eisen, M. Siegel, P. J. Fitzgerald, B. Sherman and A. Silverstein: J. of Immun. **65**, 559 (1950). — Sperber, J.: Scand. J. Clin. Labor. Invest. **1**, 345 (1949). — Shannon, J. A.: Physiologic. Rev. **19**, 63 (1939). — Ullrich, K. J. F. O. Drenckhahn u. K. H. Jarausch: Pflügers Arch. **261**, 62 (1955). — Ullrich, K. J.: Persönliche Mitteilung 1955. — Vimtrup, B.: Scand. J. Clin. Labor. Invest. **1**, 339 (1949). — Wirz, H.: Helvet. physiol. Acta **11**, 20 (1953). — Wirz, H., B. Hargitay u. W. Kuhn: Helvet. physiol. Acta **9**, 196 (1951). — Wirz, H., in Frey: Pathologische Physiologie und Klinik der Nierensekretion. Springer: Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955.

Dr. F.-O. Drenckhahn, Borstel über Bad Oldesloe, Tuberkulose-Forschungsinstitut

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 456—466 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Vorkommen und Anreicherung von Inosit und Insitderivaten in den Zellfraktionen von Gehirn und Leber*

Von

DIETER MAIBAUER und HANS HERKEN

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. November 1955)

Unter den zahlreichen Isomeren der Hexaoxycyclohexane ist der Meso-Inosit in fast allen pflanzlichen und tierischen Zellen mit chemischen und biologischen Methoden nachgewiesen worden. Die sterische Struktur wurde schon vor längerer Zeit von G. DANGSCHAT u. H. O. L. FISCHER (1942) und unabhängig von TH. POSTERNAK (1942) aufgeklärt. Seine wichtige Rolle als Wuchsstoff für verschiedene Mikroorganismen ist wiederholt bestätigt worden. F. KÖGL u. W. VAN HASSELT (1936) haben als erste bewiesen, daß der Faktor Bios I mit dem Meso-Inosit identisch ist. Es ist aber bisher nicht gelungen, die physiologische Bedeutung des Meso-Inosits für den Stoffwechsel der Warmblüterzellen befriedigend zu erklären.

E. KLENK u. R. SAKAI (1939) konnten Meso-Inosit als Molekülbaustein von Lipoiden der Sojabohne nachweisen, ein Befund, der später von D. W. WOOLLEY (1943) bestätigt wurde. Einige Zeit später fand F. FOLCH (1949) phosphorylierte Verbindungen des Meso-Inosits bei der Isolierung und Trennung von Lipoiden aus Organen von Warmblütern. Eine genaue Analyse dieser Substanz ergab, daß der Inosit hier mit 2 Molekülen Phosphorsäure in meta-Stellung verestert ist. Die Verbindung — von FOLCH Diphosphoinositid genannt — ist am Aufbau bestimmter Lipoide beteiligt. Die genaue Struktur dieser Substanzen ist noch nicht völlig geklärt. Wahrscheinlich enthalten sie auch Fettsäuren.

Nach Auffindung der anticonvulsiven Wirkungen verschiedener isomerer Hexachlorcyclohexane haben wir uns mit dem Vorkommen und dem Stoffwechsel des Meso-Inosits und seiner Derivate in Warmblüterzellen beschäftigt. Die Beziehung dieser Verbindungen zu den Hexachlorcyclohexanen ist auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit schon häufig diskutiert worden. Der ursprünglich von R. E. SLADE (1945)

* Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung der Arbeit.

angenommene biologische Antagonismus zwischen dem γ-Hexachlorcyclohexan und dem Meso-Inosit konnte von W. H. Schopfer, Th. Posternak u. M. L. Boss (1947) nicht bestätigt werden. Auch I. Simon (1955) fand an einer inositbedürftigen Mutante von Neurospora crassa keine Aufhebung der wachstumshemmenden Wirkung des γ-Hexachlorcyclohexans durch Inosit. In früheren Versuchen hatten wir bei der Prüfung der neurotropen Eigenschaften verschiedener Hexachlorcyclohexane unter bestimmten Bedingungen einen Antagonismus zwischen dem β-Hexachlorcyclohexan und dem Meso-Inosit beobachtet, wenn Cardiazolkrämpfe als Test benutzt wurden (H. Herken, 1952). Auch hier handelt es sich sehr wahrscheinlich nicht um einen Verdrängungseffekt; W. H. Schopfer u. Th. Posternak (1948) haben schon vor längerer Zeit darauf hingewiesen, daß die räumliche Anordnung des β-Hexachlorcyclohexans nicht dem Meso-Inosit, sondern dem Scyllit entspricht.

Auf Grund der beobachteten zentralen Wirkungen interessierte uns in erster Linie das Verhalten von Meso-Inosit in den Gehirnzellen. Zur Kontrolle der Befunde wurden daneben auch andere Organe untersucht.

Methodik

Nachweis und Bestimmung des Meso-Inosits erfolgte mikrobiologisch. Der Methode lag das Verfahren von Atkin (1950) und Mitarbeitern zugrunde. Als Testorganismus diente eine Hefe (Saccharomyces Carlsbergensis 4228 ATCC 9080).

Die Methode beruht darauf, daß die Hefe zum optimalen Wachstum Inosit benötigt. Bei Verwendung eines geeigneten Nährmediums, das alle übrigen zum Wachstum erforderlichen Stoffe in ausreichender Konzentration enthält, ist das Wachstum der Hefe ausschließlich von der zugesetzten Menge Inosit abhängig. Die Intensität dieser Wirkung wurde mit einem Photozellencolorimeter nephelometrisch bestimmt. Je 5 cm³ des Mediums [Nr. 43, P. György (1950)] wurden in 100 cm³ Erlenmeyer-Kolben einpipettiert, eine bestimmte Menge (im allgemeinen 1 cm³) der zu untersuchenden Flüssigkeit hinzugesetzt und mit physiologischer NaCl-Lösung auf 10 cm³ aufgefüllt. Bei der notwendigen Sterilisation soll der Druck im Autoclaven nicht über 0,5 atü hinausgehen. Sonst besteht die Gefahr, daß die Glucose durch Karamelisierung zur Färbung der Kulturflüssigkeit führt und die nephelometrisch ermittelten Werte verfälscht. Die Hefe wurde am Tage vor dem Versuch auf Bierwürzeagar ausgeimpft und über Nacht bei 30° C incubiert, die Zellen am nächsten Tag mit steriler physiologischer Kochsalzlösung vom Agar abgeschwemmt, einmal gewaschen, in der NaCl-Lösung suspendiert und durch sterile Watte gefiltert. Je ein Tropfen dieser Zellsuspension diente als Inoculum der Versuchsansätze. Die Inkubation dauerte etwa 18 Std. Kurzes Erhitzen im Autoclaven beendete das Wachstum der Kulturen. In jedem Versuch wurden gleichzeitig Kulturen mit bekanntem Inositgehalt angesetzt und wie oben behandelt. Diese in einer Kurve zusammengefaßten Meßwerte konnten dann mit den anderen Messungen verglichen werden. Jede Bestimmung geschah dreifach unter Verwendung der Mittelwerte.

Die Abb. 1 läßt deutlich die Abhängigkeit des Wachstums der Hefe von der Menge des zugesetzten Wuchsstoffes erkennen, so daß sich mit Hilfe dieses Verfahrens genaue Analysen unbekannter Wuchsstoffmengen durchführen lassen. Bei

Verwendung von Saccharomyces Carlsbergensis und Cerevisiae ist der Nachweis streng spezifisch. Woolley (1941) hat gefunden, daß nur freier Meso-Inosit das Wachstum steigert. Verschiedene Isomere, Äther oder Polyester des Inosits waren gar nicht, der Monophosphorsäureester dieses Oxycyclohexans nur äußerst schwach wirksam.

Im Verlaufe unserer Untersuchungen erwies es sich als notwendig, die gesamte Inositmenge in den Warmblüterzellen festzustellen. Dabei mußte eine vollständige Hydrolyse der Gewebe vorgenommen werden. Hier ergab sich die Schwierigkeit, daß diese Ansätze vielfach gefärbt waren und folglich nicht direkt gemessen werden konnten. In diesen Fällen wurden die Hefezellen abzentrifugiert (W. E. Taylor u. J. M. McKibbin, 1953) und für die Messung im Colorimeter in dem gleichen Volumen Wasser wieder aufgenommen. Die Brauchbarkeit dieses Verfahrens wurde durch Kontrollen mit Saccharose-Lösung, die durch Kochen mit 4 n-Salzsäure verfärbt waren, geprüft. Nach Entfernung der Säure konnte der zugesetzte Inosit jeweils quantitativ wiedergefunden werden.

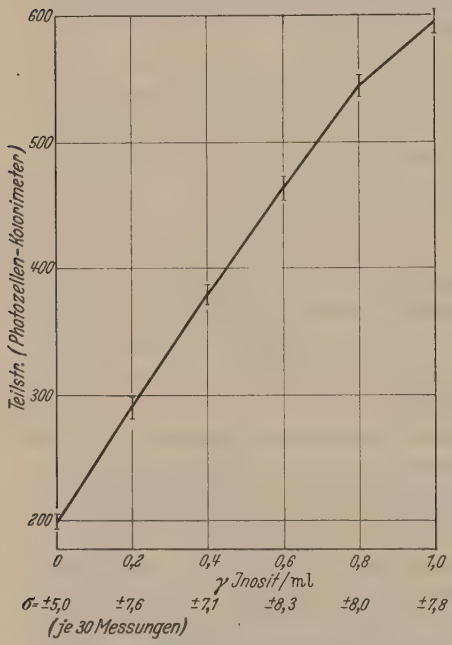


Abb. 1. Abhängigkeit des Wachstums von Sacch. carlsb. vom Inositgehalt des Kulturmediums (nephelometrisch bestimmt)

Um mögliche Störungen durch andere in den zu untersuchenden Lösungen befindliche Stoffe auszuschließen, wurden sowohl bei der Bestimmung des freien als auch des gebundenen Inosits bekannte Inositmengen als Kontrolle zugesetzt. Sie konnten nahezu quantitativ (90 bis 95%) wiedergefunden werden. Die benutzte biologische Methode hat vor der chemischen Inositbestimmung den Vorzug, daß sie den Nachweis sehr kleiner Mengen auch bei Anwesenheit solcher Substanzen gestattet, die die chemische Analyse stören.

Mit Hilfe dieses Verfahrens wurde zunächst die Freisetzung von Inosit durch verschiedene Gewebe im Stoffwechselversuch geprüft. Als Versuchstiere dienten in erster Linie Ratten und Mäuse, vereinzelt auch Kaninchen und Katzen. Die Organe wurden nach Dekapitation des Tieres entnommen und Schnitte angefertigt. Sie wurden in Warmblüter-Ringer bei Gegenwart eines Phosphatpuffers (p_H 7,3) und Glucose (100 mg-%) suspendiert und in der Warburg-Apparatur 1,5—2 Std bei 37° C incubiert. Danach wurden die Schnitte getrocknet und gewogen, die Lösung auf den nunmehr darin enthaltenen Inosit untersucht (H. Herken u. D. Maibauer (1), 1954; D. Maibauer, 1954). Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1. *Freisetzung von Inosit aus verschiedenen Geweben* (Versuchsdauer 90 min)

Organ	γ-Inosit/mg Trockengewicht	Zahl der Versuche
Gehirn (gesamt)	2,0—4,4	58
Gehirn (Rinde)	3,1—3,7	5
Gehirn Stammganglien)	4,0—4,1	5
Periphere (Ganglien (smp.)	2,4—4,0	10
Leber	0—0,3	37
Pankreas	0	6
Nebenniere	0,3	1
Schilddrüse	0,4	2
Niere	1,2—2,9	15

In dieser Versuchsanordnung geben das Gehirngewebe und ebenso sympathische Ganglien im Verlauf von 2 Std beträchtliche Mengen Inosit an die Suspensionsflüssigkeit ab. Die Versuche mit Nierengewebe

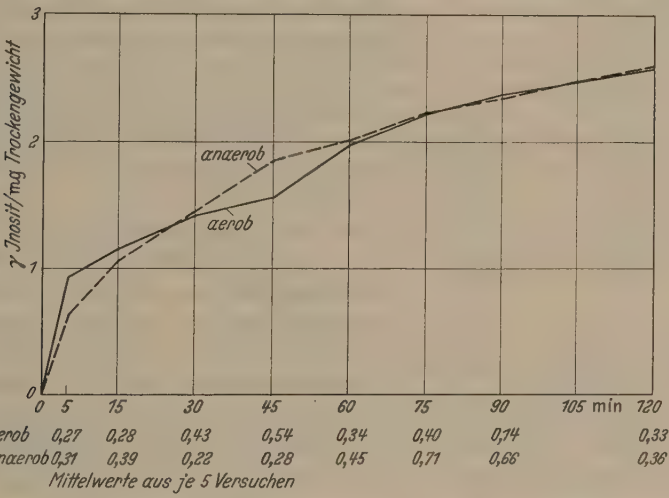


Abb. 2. Freisetzung von Inosit als Funktion der Zeit (Gehirn, Ratte)

werden durch den stark inosithaltigen Harn sehr gestört. Der nachgewiesene Wuchsstoff stammt wahrscheinlich nicht aus den Nierenzellen. Es ist sehr auffällig, daß Leber, Pankreas und Schilddrüse auch in langanhaltenden Versuchen keinen freien Inosit abgeben, obwohl in den Geweben, vor allem in den Lipoiden der Leber ganz beträchtliche Mengen Inosit in gebundener Form gefunden werden konnten.

Die Untersuchungen des zeitlichen Verlaufes der Freisetzung von Inosit ergaben, daß dieser Prozeß ungefähr nach 2 Std beendet war. Bei der Analyse des Vorganges wurden die Stoffwechselversuche nach verschiedenen Zeiten unterbrochen und die freigesetzte Menge Inosit im biologischen Test pro Milligramm Trockengewicht bestimmt. Hierbei

erwies es sich als gleichgültig, ob aerobe oder anaerobe Bedingungen eingehalten wurden (Abb. 2). Wenn der freigesetzte Inosit aus den Lipoiden des Nervengewebes stammt, so müßte nach Ablauf dieser Reaktion nur noch sehr wenig oder kein Inosit im Gewebe nachzuweisen sein. Zur Klärung dieser Frage wurde das Gewebe nach Abschluß der geschilderten Stoffwechselversuche einer sauren Hydrolyse unterworfen.

Gehirnschnitte (Ratte) wurden unter den beschriebenen Bedingungen 2 Std incubiert, dann aus der Lösung herausgenommen, gewaschen und mit 4 n-HCl 40 Std unter Verwendung eines Rückflußkühlers hydrolysiert. Nach Abdestillation der Säure im Vakuum und Aufnahme des Rückstandes in Wasser erfolgte der Inositnachweis in der schon beschriebenen Weise.

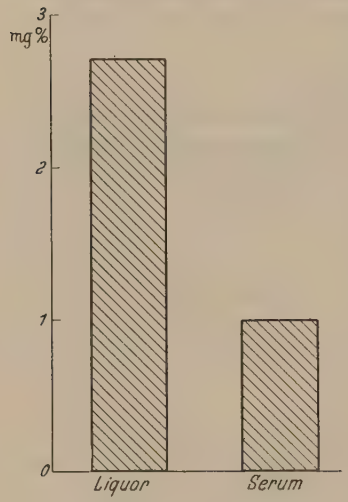


Abb. 3. Inositgehalt von Liquor und Serum (Mensch). (Die angegebenen Zahlen sind Mittelwerte aus mehreren Versuchen. Zahl der Experimente in Klammern)

Bei diesen Versuchen stellte sich heraus, daß nach der salzsauren Hydrolyse des Gewebes noch einmal 3 γ Inosit pro Milligramm Trockengewicht des Hydrolysates nachgewiesen werden konnten. Dieser Wert stimmt gut mit dem von W. E. Taylor u. J. M. McKibbin (1953) nach salzsaurer Hydrolyse von Gehirnlipoiden ermittelten Werte überein. Aus dem Vergleich der Ergebnisse dieser Autoren mit den von uns gefundenen Gesamtmengen kann jedoch entnommen werden, daß die mit anderer Methodik arbeitenden amerikanischen Autoren den Anteil nicht erfassen konnten, der in den Stoffwechselversuchen vom Gewebe abgegeben wird. Die gesamte Menge an Inosit im Zentralnervensystem ist daher wesentlich höher als bisher in der Literatur beschrieben wurde.

Aus den von uns erhobenen Befunden läßt sich schließen, daß Inosit im Nervengewebe in zwei Fraktionen vorkommt:

1. Fest gebunden, wahrscheinlich in dem von Folch isolierten Lipoid.

2. Leicht verfügbar, entweder als freier Inosit oder als Ester, der durch die Enzyme des Gewebes schnell gespalten wird.

Die auffallende Freisetzung beträchtlicher Mengen Inosits aus dem Nervengewebe könnte natürlich ihre Ursache in einer Schädigung der Zellen haben, die sich hier stärker auswirkt als an anderen Geweben. Vergleichende Untersuchungen des Inositgehaltes von normalem menschlichem Liquor und Blutserum ergaben jedoch in Übereinstimmung mit den Angaben von D. A. Nixon (1953), daß die Rückenmarksflüssigkeit

etwa 3—4 mal mehr Inosit in der Volumeneinheit enthält als das Serum [H. Herken u. D. Maibauer (2), 1954] (Abb. 3).

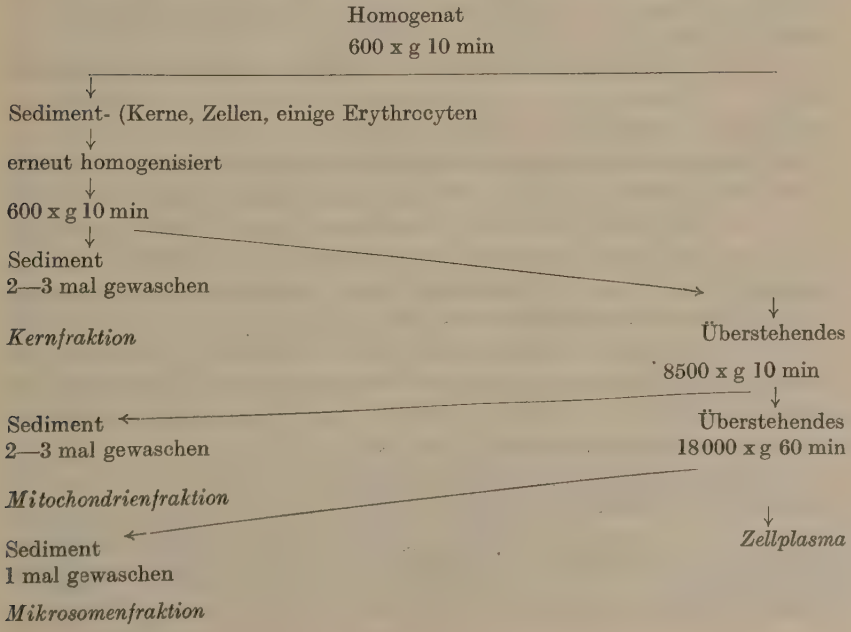
Die bisher mitgeteilten Befunde sprechen für eine besondere Affinität des Meso-Inosits zum Gehirngewebe, wobei eine Anreicherung dieser Verbindung in den Nervenzellen möglich schien. Eine weitere Aufklärung dieser Frage konnte nur durch Untersuchungen der einzelnen Zellfraktionen erreicht werden.

Bei den vergleichenden Untersuchungen wurden vor der Aufarbeitung des Gehirns zunächst einmal die Zellfraktionen der Leber dargestellt und ihr Inosit-Gehalt ermittelt.

a) Präparation der Leberzellfraktionen nach W. C. Schneider *(1951) in 0,25 mol Saccharoselösung.* 200 g schwere Albinoratten beiderlei Geschlechtes wurden dekapitiert, die Pfortadern nach dem Ausbluten präpariert und die Leber in situ von hier aus mit eiskalter Saccharoselösung (0,25 mol) durchströmt. Das Organ wurde dann aus dem Körper entnommen und durch ein Nylonsieb gerührt, die so gewonnene Leberpulpa nach Verdünnung mit der Saccharoselösung (etaw 1:10) im Apparat nach Potter-Elvehjem homogenisiert. Nach nahezu vollständiger Zerstörung der Zellmembranen (mikroskopische Kontrolle) konnte das Homogenat durch fraktionierte Zentrifugierung in die einzelnen Zellbestandteile (Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Zellplasma) zerlegt werden.

Der Arbeitsgang ist aus folgendem Schema ersichtlich. (Verwendet wurde eine schnellaufende und gekühlte Zentrifuge, die „Eispirouette" der Firma Phywe, Göttingen.)

Tabelle 2. *Schema des Arbeitsganges bei der Zellfrakionierung* (Leber)



b) Präparation der Zellfraktionen des Gehirns nach T. M. Brody *u.* J. A. Bain (1952). Die Aufarbeitung von Gehirngewebe geschah in analoger Weise. Jedoch bereitete die Fraktionierung dieses Organes größere Schwierigkeiten. Die Vielgestaltigkeit der Zellstruktur des Gehirnes bringt es mit sich, daß bei der Homogenisierung auch Neuritenstücke usw., sofern sie gleich schwer sind, in die „Kernfraktion" mit eingehen. Eine ausreichende Reindarstellung wurde durch Abtrennung der größeren Partikelchen (Erythrocyten, Neuriten und Zellbruchstücke) bei niedrigen Tourenzahlen erreicht.

Die Fraktionen hatten nach der Aufarbeitung folgende morphologische Zusammensetzung:

1. Gewebsfetzen, Zellen, Kerne, einige Mitochondrien, Erythrocyten.
2. Kerne, einige Mitochondrien.
3. Mitochondrien (1—4 μ).
4. Mikrosomen ($< 1\ \mu$).
5. Zellplasma.

Die beiden ersten Fraktionen werden im folgenden als 1. und 2. Kernfraktion bezeichnet. Die Fraktionen 3—5 ließen sich in der gewünschten morphologischen Reinheit darstellen.

Arbeitsgang: Albinoratten beiderlei Geschlechtes im Gewicht von etwa 150 g wurden dekapitiert, die Gehirne entnommen, der Liquor nach Eröffnung der Ventrikel durch mehrmaliges Waschen entfernt, und das Nervengewebe wie bei der Präparation der Leber homogenisiert. Eine Durchströmung des Organes erübrigte sich, da nach der Dekapitation praktisch kein Blut mehr in den Gefäßen vorhanden war. Auch hier wurde das Ausmaß der Homogenisierung mittels jeweils entnommener Proben im Phasenkontrastmikroskop laufend kontrolliert. Die fraktionierte Zentrifugierung wurde — wie bei der Aufarbeitung von Lebergewebe geschildert — vorgenommen. Fraktion 1 wurde bei 800 x g, Fraktion 2 bei 1500 x g, Fraktion 3 bei 10000 x g abgetrennt.

Die Zellfraktionen beider Organe wurden in folgender Weise differenziert:

1. Durch Vitalfärbung mit Janusgrün B.

2. Durch Bestimmung der Succinoxydase-Aktivität in der Warburg-Apparatur. Hierbei wurden die Zellfraktionen in Phosphat-Puffer ($2 \cdot 10^{-2}$ m) bei Gegenwart von Na-Succinat (Leber: $1 \cdot 10^{-2}$ m; Gehirn $1{,}3 \cdot 10^{-2}$ m) bei 37° C incubiert und der Sauerstoffverbrauch nach der direkten Methode in der üblichen Weise bestimmt. Die übrige Zusammensetzung der Reaktionsmischung richtete sich nach den Angaben von Martius u. Hess (1955, Leber) sowie von Brody u. Bain (1952, Gehirn). Ein starker Sauerstoffverbrauch trat erwartungsgemäß nur bei der Mitochondrienfraktion auf. Der Sauerstoffverbrauch der übrigen Fraktionen war gering.

Tabelle 3. *Sauerstoffverbrauch der Zellfraktionen. (Substrat: Na-Succinat)*

	Kernfraktion I	Kernfraktion II	Mitochondrien	Mikrosomen	Plasma
Leber QO_2 (N)	—	27	415	16,2	25
Gehirn QO_2 (N).	70	3	170	30	—

Der im Verhältnis zu den Mitochondrien der Leber niedrige Sauerstoffverbrauch der gleichen Fraktion aus Gehirnzellen ist wahrscheinlich auf geringe Verunreinigungen durch andere Zellbruchstücke zurückzuführen, die bei der Aufarbeitung dieses Organes nicht restlos entfernt werden können. Da die Mitochondrienfraktion des Gehirns nur zweimal ausgewaschen wurde, können Schädigungen des Cytochrom-Systems kaum zur Erklärung der Unterschiede herangezogen werden.

Die Prüfung anderer chemischer Leistungen der Mitochondrien war zur Klärung der speziellen Fragestellung über die Verteilung von Inosit in den Gewebefraktionen nicht erforderlich.

3. Die Prüfung auf morphologische Reinheit der Fraktionen geschah durch Untersuchung mit dem Phasenkontrastmikroskop.

Der Inositgehalt der einzelnen Zellbestandteile wurde vor und nach salzsaurer Hydrolyse analysiert.

a) Bestimmung des freien Inosits. Im allgemeinen genügte eine Verdünnung der Zellfraktionen mit H_2O im Verhältnis 1:5. Lediglich der hohe Inositgehalt des Zellplasmas der Gehirnzellen machte eine Zugabe von Wasser im Verhältnis von 1:20 notwendig. Die Lösungen wurden im Autoklaven erhitzt, das im isoelektrischen Punkt gefällte Eiweiß abzentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit analysiert.

b) Bestimmung des Gesamt-Inosits. Der gebundene Inosit konnte mikrobiologisch nicht direkt bestimmt werden, da er das Wachstum der Hefe nicht förderte. Er mußte daher in die freie Form übergeführt werden. Zu diesem Zweck wurde je 1 cm^3 der zu untersuchenden Zellfraktion mit 10 cm^3 4 n-HCl auf dem Sandbad 14 Std hydrolysiert. Nach Abdestillation der Säure im Vakuum wurde der Rückstand in 10 cm^3 Wasser aufgenommen. Je 1 cm^3 des Hydrolysates diente zur Analyse.

Der Stickstoffgehalt der einzelnen Fraktionen wurde in der üblichen Weise nach der Methode von Kjeldahl ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengestellt. Zum Vergleich wurden noch die Inositmengen im Rattenserum bestimmt.

Die vollständige Auftrennung der Fraktionen von Gehirn und Leber wurde in je 3 Versuchen durchgeführt und der Inositgehalt jeder Fraktion aus jeweils 9 Einzelmessungen für die gebundene und freie Form ermittelt.

Der Vergleich der in den Zellfraktionen von Leber und Gehirn gefundenen Inositmengen läßt deutlich die Sonderstellung des Nervengewebes erkennen. Abgesehen von der viel geringeren Gesamtmenge enthalten die corpusculären Elemente der Leber keinen freien Inosit. Er findet sich in diesem Organ nur in der Plasmafraktion. Die Gesamtmenge an Inosit ist in der Kernfraktion der Leber 3 mal geringer als im Gehirn. Lediglich in den Mikrosomen beider Organe sind die Konzentrationen annähernd gleich. Die in der Literatur niedergelegten Befunde bieten

keine einwandfreien Vergleichsmöglichkeiten mit den von uns erhaltenen Werten. Nach einer Angabe von A. Claude (1949) sollen etwa 10—12% der Phosphorlipoide der Mikrosomen aus inosithaltigen Phosphatiden bestehen. Es ist sehr auffällig, daß sämtliche Zellbestandteile des Gehirns zum Teil erhebliche Mengen an freiem Inosit aufweisen. Vielleicht deuten diese Befunde auf eine schnelle Umsetzung dieser Verbindung im Stoffwechsel des Nervengewebes hin. Diese Vermutung wird noch durch den außerordentlich hohen Gehalt der Plasmafraktion der Gehirnzellen

Tabelle 4. *Inositgehalt der einzelnen Zellfraktionen und des Blutserums*
Angaben in γ/mg N

Zellfraktion	Gehirn		Leber		Serum	
	frei	gesamt	frei	gesamt	frei	gesamt
K_1	15	40—46	—	—	—	—
K_2	6—17	45	0	12—15	—	—
M	19—25	43—50	0—4	32	—	—
Ms	15	44—56	0	44—47	—	—
P	*170—190*	*170—190*	12—16	13—18	0,5—1,7	1,4—1,7

K_1 K_2 = Kernfraktion (vgl. Text)
M = Mitochondrienfraktion
Ms = Mikrosomenfraktion
P = Zellplasma bzw. Blutserum

gestützt, der mit 170—190 γ/mg N den Plasmagehalt der Leberzellen um mehr als das 10fache übertrifft. Es ist anzunehmen, daß Inosit die Gehirnzellen auf dem Blutweg erreicht. Da im Serum der Ratte aber nie mehr als höchstens 1,7 γ/mg N nachweisbar waren, können diese Befunde nur so gedeutet werden, daß im Plasma der Gehirnzellen eine mehr als 100fache Anreicherung des Inosits möglich ist. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, daß der Gesamt-Stickstoff als Bezugssystem nur eine grobe Basis abgibt. Der Mechanismus dieses Vorganges ist noch völlig ungeklärt. Es ist aber schwer vorstellbar, daß sich die Anreicherung von Inosit ohne chemische Veränderung der Substanz vollzieht. Hier muß in erster Linie an eine intracelluläre sehr labile Phosphorylierung gedacht werden, durch die der neutrale Alkohol in eine Verbindung mit den chemischen Eigenschaften eines Anions umgewandelt wird. Dies ist wahrscheinlich auch der erste Schritt in der biochemischen Synthese der inosithaltigen Lipoide. Diese Hypothese liefert auch eine gewisse Erklärung für den Vorgang der kontinuierlichen Freisetzung von Inosit durch Hirngewebe, da dieser Monophosphorsäureester durch die Phosphatasen der Zelle leicht hydrolysiert werden kann.

Der jetzige Stand der Untersuchungen läßt keine Aussagen über die physiologische Bedeutung der festgestellten Affinität des Inosits zum Zentralnervensystem zu. In den letzten Jahren ist aber auch von anderen

Autoren auf die Sonderstellung dieser Verbindung im Stoffwechsel der Lipoide hingewiesen worden, deren Erwähnung in diesem Zusammenhang besonders interessiert. Durch Untersuchungen mit radioaktiven Isotopen ist schon lange bekannt, daß der Phosphor in den Lipoiden des Gehirns kontinuierlich ausgetauscht wird. Dieser Vorgang soll nach älteren Untersuchungen allerdings sehr langsam verlaufen. In einer neueren Arbeit hat aber R. M. C. Dawson (1954) bei seinen Messungen über den Umsatz von P^{32} in Cephalin und Lecithin mit besonderer Methodik zeigen können, daß die Synthese von Phosphorsäure und Inosit zu Diphosphoinositid mit erheblicher Geschwindigkeit abläuft. Hierbei war interessant, daß der Umsatz von radioaktivem Phosphat im Lecithin und Cephalin demgegenüber praktisch zu vernachlässigen ist. Lediglich eine Glycerophosphatfraktion nicht vollständig geklärter Struktur, die nach Ansicht von R. M. C. Dawson wahrscheinlich Phosphatidsäure darstellt, übertrifft mit ihrem Phosphatumsatz die inosithaltigen Phosphorverbindungen.

Auch diese bemerkenswerten Befunde brachten bisher keine Aufklärung über die Leistungen dieses Stoffwechsels für die Unterhaltung spezifischer Funktionen der Nervenzellen. Es liegen aber andere Untersuchungen vor, die sich mit dem Einfluß von Acetylcholin auf dem Umsatz von P^{32} in den Lipoiden befassen. M. Hokin u. L. Hokin (1954) haben gefunden, daß der Austausch von P^{32} sowohl in den cholinfreien Lipoiden, zu denen auch die inosithaltigen gehören, als auch in den cholinenthaltenden Verbindungen in Gegenwart von Acetylcholin erheblich gesteigert wird. Am isolierten Cervicalganglion der Katze gelang H. Kewitz u. H. Reinert (1954) der Nachweis, daß die erregende Wirkung des Acetylcholins, die nach Entfernung der Glucose aus der Durchströmungsflüssigkeit zum Stillstand kommt, durch Zusatz von Inosit wieder hergestellt werden kann. Die bisherigen Kenntnisse über die Struktur der inosithaltigen Lipoide machen es sehr wahrscheinlich, daß sie an Grenzflächen zwischen lipoider und wäßriger Phase der Zellen eine physiologisch bedeutsame Rolle spielen, die zur Erklärung der erwähnten Wiederherstellung der Überträgerfunktion des Acetylcholins an den Synapsen herangezogen werden kann.

Zusammenfassung

1. Bei der mikrobiologischen Auswertung von Stoffwechselversuchen mit verschiedenen Geweben wird festgestellt, daß Nervengewebe Inosit kontinuierlich in das umgebende Medium abgibt. Zwischen aeroben und anaeroben Versuchsbedingungen bestehen keine Unterschiede. Die Reaktion ist nach $1^1/_2$—2 Std beendet.

Nach Ablauf dieser Reaktion läßt sich im Gewebe noch Inosit in gebundener Form nachweisen, der erst nach salzsaurer Hydrolyse

biologisch bestimmt werden kann. Inosit ist demnach im Nervengewebe in zwei Fraktionen vorhanden:

a) In fester Bindung, wahrscheinlich in dem von Folch isolierten Lipoid.

b) Als freier Inosit oder als Ester, der durch die Enzyme des Gewebes schnell gespalten wird.

2. Menschlicher Liquor weist in der Volumeneinheit etwa 3mal mehr Inosit auf als das Serum.

3. Sämtliche Zellfraktionen von Gehirn und Lebergewebe enthalten Inosit, jedoch ist in den corpusculären Elementen der Leberzellen im Gegensatz zum Gehirn kein freier Inosit festzustellen. Die größte Menge an freier Form wird im Plasma der Gehirnzellen nachgewiesen. Der Vergleich der Inositkonzentrationen im Plasma der Gehirnzellen mit der des Serums läßt auf einen besonderen Anreicherungsprozeß im Gehirn schließen. Der mögliche Mechanismus des Anreicherungsvorganges wird besprochen.

Literatur

Atkin, L., W. L. Williams, A. S. Schultz and C. N. Frey: zit. nach P. György, Vitamin Methods, New York 1950. — Brody, T. M., and J. A. Bain: J. of Biol. Chem. **195**, 685 (1952). — Claude, A.: Adv. Protein Chem. **5**, 423 (1949). — Dangschat, G., u. H. O. L. Fischer: Naturwissenschaften **30**, 146 (1942). — Dawson, R. M. C.: Biochemic. J. **55**, 507 (1953). — Folch, J.: J. of Biol. Chem. **177**, 497 (1949). — Herken, H.: Ärztl. Wschr. **1952**, 545. — Herken, H., u. D. Maibauer: (1) Naturwissenschaften **1954**, 166. — (2) Klin. Wschr. **1954**, 1113. — Hokin, M., and L. Hokin: J. of Biol. Chem. **209**, 549 (1954). — Kewitz, H., u. H. Reinert: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 315 (1954). — Klenk, E., u. R. Sakai: Z. physiol. Chem. **258**, 33 (1939). — Kögl, F., u. W. van Hasselt. Z. physiol. Chem. **242**, 74 (1936). — Maibauer, D.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 131 (1955). — Martius, C., u. B. Hess: Biochem. Z. **326**, 191 (1955). — Nixon, D. A.: J. of Physiol. **119**, 18 P (1953). — Posternak, Th.: Helvet. chim. Acta **25**, 746 (1942). — Potter, V. R., and C. A. Elvehjem: J. of Biol. Chem. **114**, 495 (1936). — Schneider, W. C.: zit. nach Umbreit, Burris and Stauffer: Manometric Techniques and Tissue Metabolism, Minneapolis 1951. — Schopfer, W. H., T. Posternak u. M. L. Boss: Schweiz. Z. allg. Path. **10**, 443 (1947). — Rev. int. de Vitamol. **20**, 121 (1948). — Simon, I.: Diss. 1955 Freie Universität Berlin. — Slade, R. E.: Chem. and Ind. 314 (1945), zit. nach W. H. Schopfer, Th. Posternak u. M. L. Boss: Schweiz. Z. allg. Path. **1947**. —Taylor, W. E., and J. M. McKibbin: J. of Biol. Chem. **201**, 609 (1953). — Woolley, D. W.: J. of Biol. Chem. **140**, 461 (1941); **147**, 581 (1943).

Prof. Dr. Herken, Berlin-Dahlem, Pharmakol. Institut der Freien Universität

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 467—469 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Schulemann)

Einfache Apparatur zur Konstanthaltung von Gaskonzentrationen bei toxikologischen Untersuchungen

Von
O. R. Klimmer

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 30. November 1955)

Bei langfristigen Arbeiten mit kleinsten Gaskonzentrationen, wie sie besonders bei gewerbetoxikologischen Studien im Tierversuch notwendig werden, müssen diese Konzentrationen über viele Monate hinweg konstant und jederzeit reproduzierbar gehalten werden. Bei käuflichen,

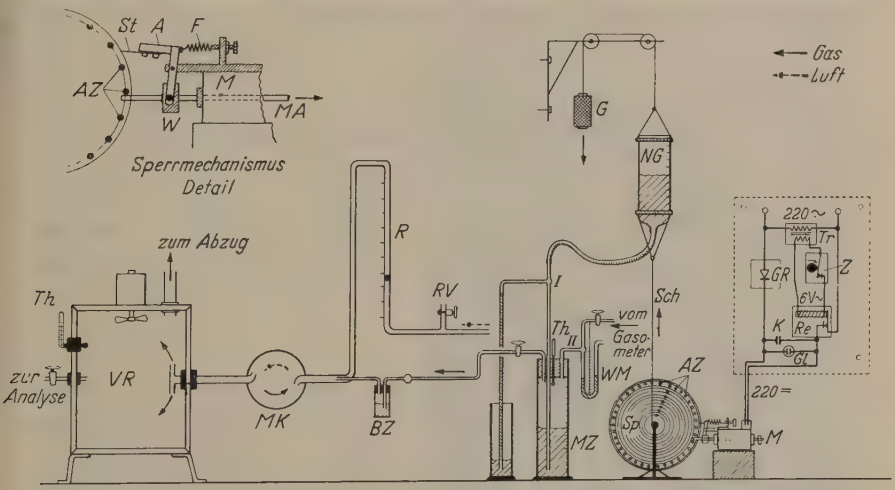


Abb. 1. Schematische, nicht maßstabgerechte Zeichnung einer automatischen Strömungsapparatur. *A* Anker, *AZ* Arretierungszapfen, *BZ* Blasenzähler, *F* Feder, G Gewicht, *Gl* Glimmlampe, *GR* Gleichrichter, *K* Kondensator, *M* Magnet, *MA* Messingachse, *MK* Mischkugel, *MZ* Meßzylinder, *NG* Niveaugefäß, *R* Rotameter, *Re* Relais. *RV* Regulierventil, *Sch* Bremsschnur, *Sp* Sperrscheibe, *St* Stahlfeder, *Th* Thermometer, *Tr* Transformator, *VR* Versuchsraum, *W* Weicheisenanker, *WM* Wassermanometer, *Z* Zeitgeber, *I* u. *II* Dreiwegehahn

komprimierten Gasen wie z. B. Acetylen, CO, CO_2, $COCl_2$, N_2, O_2 u. a. m. ist deren genaue Dosierung und Mischung untereinander und mit Luft über Reduzier- und Nadelventile möglich[2, 4, 5].

Schwieriger wird das Problem, wenn man die zu untersuchenden Gase selbst herstellen und in Gasometern unter Normaldruck aufbewahren

muß (Nitrose Gase, AsH_3, PH_3 und dergl.). Werden sie aus einem Behälter durch zufließende Sperrflüssigkeit verdrängt, so kann sich dabei der Druck und damit der Ausstrom ändern (vgl. Wirth[6]), und selbst bei Konstanthaltung des Druckes (Mariottesche Flasche) muß immer noch der Ausstrom durch ein Ventil von Hand gesteuert werden (vgl. z. B. Kiese[1]). Die von Ventilen unabhängige Apparatur nach Neumann u. Klimmer[3] erfordert erheblichen technischen Aufwand beim Bauen. Wesentlich einfacher ist eine Anordnung, deren Aufbau und Schaltung aus dem Schema Abb. 1 hervorgehen.

Prinzip

Das in einem Gasometer befindliche reine oder mit N_2 verdünnte Gas wird vor Versuchsbeginn in einen Meßzylinder von 1—3 l Inhalt (*MZ*) übergeleitet und dann aus diesem mit einer Druckflüssigkeit, in der es sich nicht oder nur in Spuren lösen darf, kontinuierlich verdrängt. Nach Durchgang durch einen als Ventil wirkenden Blasenzähler (*BZ*) mischt sich das Gas mit einem durch ein Rotameter (*R*) gemessenen, konstanten Luftstrom (500—5000 l/h) in einer Mischkugel (*MK*); das Gemisch strömt in einen Versuchsraum (*VR*) und aus diesem in den Abzug. Aus dem Gasluftgemisch, dessen Menge pro Stunde mindestens dem 5fachen Inhalt des Versuchsraumes entsprechen sollte, können beliebig oft und ohne Absinken der Versuchskonzentration Proben zur Analyse entnommen werden.

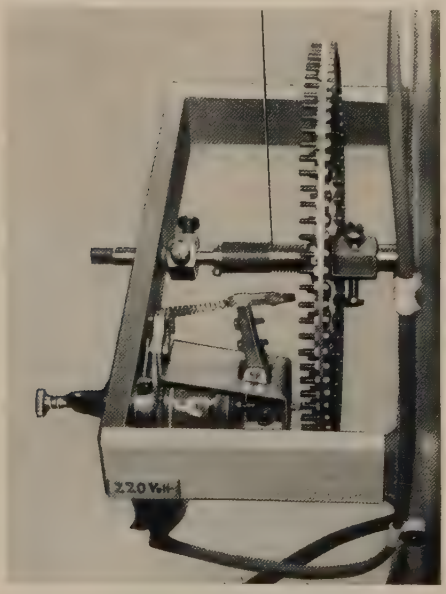


Abb. 2 Der Sperrmechanismus

Steuerungsmechanismus

Der Druck im Meßzylinder (*MZ*) und die in der Zeiteinheit strömende Gasmenge werden durch praktisch kontinuierliches Heben des Niveaugefäßes (*NG*) konstant gehalten; beide Gefäße haben gleichen Querschnitt. Das Niveaugefäß (*NG*) tritt in dem Maße höher, als es die auf der Achse der Sperrscheibe (*Sp*) aufgespulte Nylon-Bremsschnur (*Sch*) erlaubt. Dieser Vorgang hängt von dem Durchmesser der Sperrscheibenachse und von der Winkelgeschwindigkeit der Sperrscheibe ab, die sich nach der Anzahl (36—90) der

Arretierungszapfen (*AZ*) und dem zeitlichen Abstand, in dem die Arretierungen freigegeben werden, richtet.

Den eigentlichen Sperrmechanismus zeigt Abb. 2. Ein über den Zeitgeber (*Z*) (Fa. Braun-Melsungen, 220/6 Volt, Impulse 0,5—60 sec) mit einem Relais (*Re*) verbundener kräftiger Elektromagnet (*M*) zieht bei Stromschluß den auf einer verschiebbaren Messingachse (*MA*) sitzenden Weicheisenanker (*W*) an, wobei die Spitze dieser Achse einen Arretierungszapfen freigibt, während das andere Ende des als Kipphebel gebauten Ankers (*A*) mittels einer Stahlfeder (*St*) gleichzeitig einen der nächsten Arretierungszapfen für einen Moment abfängt, ehe der Anker (*A*) von der Feder (*F*) wieder in die Ruhelage zurückgeholt wird. Die elektrischen Schaltelemente sind von der eigentlichen Apparatur getrennt, ihr Funktionieren wird durch eine Glimmlampe (*GL*), der Gasdruck im Meßzylinder durch ein Wassermanometer (*WM*) kontrolliert.

Der in unserer Werkstatt gebaute Apparat hält seit mehreren Monaten bei täglich 9stündiger Laufzeit beliebig konzentrierte Gasluftgemische in akuten und chronischen Strömungsversuchen einwandfrei konstant; der Steuerungsfehler beträgt in 9 Std 0,21%. Die gesamte Apparatur, die aus Sicherheitsgründen unter einem Abzug steht, benötigt eine Tischfläche von etwa 2 m^2.

Zusammenfassung

Zur Herstellung konstant zusammengesetzter Luftgasgemische wird eine einfache Apparatur beschrieben, die mittels Zeitgeber und Sperrscheibe automatisch gesteuert wird und eine große Variationsbreite besitzt. Sie eignet sich für akute und vor allem für chronische Strömungsversuche bei toxikologischen Untersuchungen kleiner Mengen selbsthergestellter Gase.

Literatur

[1] Kiese, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **186**, 337—376 (1937). — [2] Klimmer, O. R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **201**, 69—98 (1943). — [3] Neumann, W., u. O. R. Klimmer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **191**, 501—504 (1939). — [4] Wirth, W., H. Wienecke u. F. Kirchner: Schmerz, Narkose u. Anästhesie **1930**, 1—16. — [5] Wirth, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 198—206 (1936). — [6] Wirth, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **157**, 264—285 (1930).

Prof. Dr. O. R. Klimmer, Pharmakolog. Institut der Universität Bonn, Reuterstr. 2b

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 470—473 (1956)

Aus dem Hallerianum, Bern

Der Einfluß von N-Acetylglutaminsäuredinitril auf Nervenzellen

(Kurze Mitteilung)

Von

H. Bammer

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 28. November 1955)

Einige Homologe aus der Reihe der Dinitrile[$CN\text{-}(CH_2)_n\text{-}CN$] beeinflussen die Nucleoproteidfraktion in Nervenzellen und beschleunigen die Regeneration durchschnittener Hornhautnerven (Hydén[6, 7]; von Muralt u. Mitarb.[3, 4, 8, 9]). Der Wachstumsreiz der Dinitrile scheint, so könnte man aus den Versuchen von Hintzsche[5] über die Wirkung von Succinodinitril auf embryonale Spinalganglienzellen schließen, nur kurz und vorübergehend zu sein.

An isolierten Spinalganglienzellen vom Hühnerembryo soll nun geprüft werden, ob auch ein Dinitril geringerer Toxicität den gleichen Wirkungsverlauf zeigt. Diese Versuche sollen damit einen Beitrag zu der noch ungeklärten Frage nach dem Mechanismus der Dinitrilwirkung auf Nervenzellen liefern.

N-Acetylglutaminsäuredinitril hat ein Molekulargewicht von 151. Die wäßrige Lösung ist, auch gegenüber Erhitzen auf 100° C, sehr beständig. Die LD_{50} für Mäuse beträgt: 850 mg/kg.

In diesen Versuchen wurde N-Acetylglutaminsäuredinitril in folgenden Konzentrationen angewandt: $2{,}08 \cdot 10^{-5}$ m (a), $4{,}16 \cdot 10^{-5}$ m (b) und $8{,}32 \cdot 10^{-5}$ m (c). Diese Konzentrationen wurden gewählt, um sie mit bereits erwähnten Versuchen mit Succinodinitril vergleichen zu können. Sie bezogen sich auf den ganzen Kulturansatz, der sich aus einem Tropfen Tyrodelösung (Zellaufschwemmung mit Gewebsextrakt) und einem Tropfen Hühnerplasma zusammensetzte. Die Kulturen wurden nach der Methode von Hintzsche[5] in der Abteilung für Gewebekultur des Theodor Kocher-Institutes, Bern, angelegt.

Die Zahl der regenerierten Zellen mit neuen Fortsätzen in den einzelnen Ansätzen wurde in der Abteilung für Gewebekultur des Theodor Kocher-Institutes in Bern bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung kurz zusammengefaßt. Zur Erklärung sei auf die Legende verwiesen. Die Abbildung zeigt, daß N-Acetylglutaminsäuredinitril in den Konzentrationen (a) und (b) in den ersten 48 Std auf das Wachstum der

neuen Zellfortsätze vorübergehend anregend wirkte. Die Gesamtzahl der regenerierten Zellen nach 96 Std lag bei allen Ansätzen mit Dinitrilzusatz (a, b u. c) tiefer als bei den Kontrollen.

Der Beginn dieser vorübergehenden Reizwirkung des Dinitrils dürfte wesentlich früher liegen, als man aus dem Auswachsen der Zellfortsätze entnehmen kann. Die Beobachtung der Ultraviolettabsorption der einzelnen Zellen innerhalb der ersten 24 Std sollte hier weiteren Einblick gewähren.

Die Absorptionsmessung erfolgte in einem UV-Mikroskop mit Quarz- oder Spiegeloptik. Die Lichtintensität wurde mit einem Photomultiplier gemessen, an den

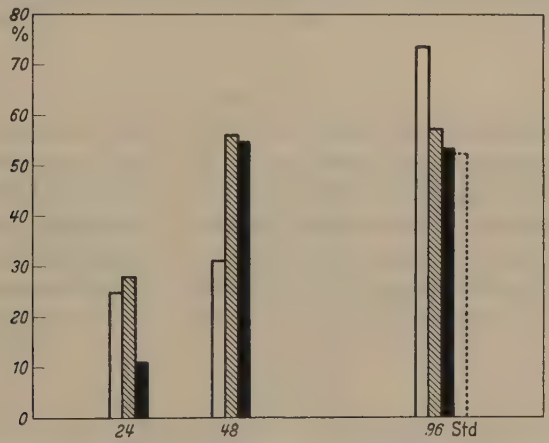


Abb. 1. *Zahl der regenerierten Zellen nach verschiedener Einwirkungsdauer von N-Acetylglutaminsäuredinitril.* Spinalganglienzellen vom Hühnerembryo in Gewebekultur. Ordinate: Regenerierte Zellen mit neuem Fortsatz in Prozent aller intakten Zellen in einem Ansatz. Abszisse: Zeit in Stunden vom Beginn der Dinitrilwirkung und der Auspflanzung an. — Leere Säulen: Kontrollen. Zusatz von N-Acetylglutaminsäuredinitril zum Nährboden: schraffierte Säulen ($2.08 \cdot 10^{-5}$ m), ausgefüllte Säulen ($4{,}16 \cdot 10^{-5}$ m), punktierte, leere Säule ($8{,}32 \cdot 10^{-5}$ m)

ein Gleichspannungsvoltmeter angeschlossen war. Es wurde monochromatisches Licht benutzt. Die Extinktionen im Bereich verschiedener Wellenlängen wurden in einem Felde von etwa 5 μ Seitenlänge im Cytoplasma der einzelnen Zelle bestimmt. Die Versuchsanordnung und UV-Absorptionsmessung an Spinalganglienzellen in vitro wurden von Bammer u. Hoppe[2] und von Bammer[1] ausführlich beschrieben, so daß in bezug auf Einzelheiten auf diese Arbeiten verwiesen werden kann.

Regenerierende Spinalganglienzellen zeigen im UV-Absorptionsspektrum eine Absorptionsbande im Bereich der maximalen Nucleinsäureabsorption (265 mμ). Diese fehlt allen Zellen, die nicht auswachsen (Bammer[1]). In dem vorliegenden Material wurden nun die Zahl aller Zellen (in Prozent) mit Absorptionsbande bei 265 mμ bei den Kontrollen und in den Ansätzen mit Dinitril der Konzentration (b) zu jeweils verschiedenen Zeiten bestimmt. Die Ergebnisse in Tab. 1 zeigen, daß nach 12 Std Dinitrileinwirkung die Zahl der Zellen mit einer Absorptionsbande bei 265 mμ beträchtlich über dem Wert der Kontrollen lag. Die

Gesamtzahl der angeregten Zellen war demnach 12 Std nach dem Auspflanzen höher als bei den Kontrollen. Dann fiel sie innerhalb 24 Std stark ab. Während also als Folge dieser Anregung nach 24 Std vermehrt neue Fortsätze gebildet wurden (vgl. Abbildung), zeigten sich im Nucleoproteinstoffwechsel zur gleichen Zeit hemmende Einflüsse des Dinitriles,

Tabelle 1

Zeit von Auspflanzung an Std	Zahl der Zellen mit Absorptionsbande bei 265 mμ (Prozent)	
	Kontrollen	N-Acetylglutaminsäuredinitril: $4{,}16 \cdot 10^{-5}$ m
12	70	100
24	70	82
36	63	57

indem die Zahl der Zellen mit deutlicher Nucleinsäureabsorption abnahm. Dem entsprach die herabgesetzte Zahl der regenerierten Zellen bei allen Dinitrilkonzentrationen (a, b u. c) nach 96 Std (Abbildung).

Im Verlaufe der Regeneration verliert die anfänglich sehr hohe Absorptionsbande der Zellen im Bereich des Nucleinsäuremaximums an Höhe. Diese Veränderung geht den Wachstumsvorgängen parallel. Das Verhältnis der Extinktion bei 265 mμ zu dem Zelldurchmesser (in Millimikron) war für regenerierende Zellen aus ein und demselben Ansatz

Tabelle 2

Versuch Nr.	Extinktion bei 265 mμ (E_{265})	Zelldurchmesser in Millimikron (d)	Verhältnis E_{265}/d
A_1	0,572	25	0,023
A_2	0,488	20	0,024
A_3	0,693	30	0,023
A_4	0,476	22,5	0,021
A_5	0,462	20	0,023
A_6	0,647	25	0,026
A_7	0,752	32,5	0,023

Tabelle 3

Zeit von der Auspflanzung an Std	Höhe der Absorptionsmaxima 265 mμ bezogen auf den Zelldurchmesser (Mittelwerte E_{265}/d)	
	Kontrollen	N-Acetylglutaminsäuresinitril: $4{,}16 \cdot 10^{-5}$ m
12	0,036 $M = \pm 0{,}0065$	0,014 $M = \pm 0{,}002$
24	0,0215 $M = \pm 0{,}0062$	0,0134 $M = \pm 0{,}001$
36	0,017 $M = \pm 0{,}003$	

annähernd gleich. Tab. 2 gibt hierfür ein Beispiel. Diese Größe konnte daher als Maß für die Höhe der Absorptionsbande bei 265 mμ in den Zellen eines Ansatzes dienen. Sie nahm bei den Kontrollen im Mittel von der 12. bis zur 36. Std nach dem Auspflanzen stark ab (Tab. 3). Unter den Mittelwerten in Tab. 3 sind jeweils die Streuungen (M) angeführt. In den Ansätzen mit der Dinitrilkonzentration (b), welche zu diesem Zeitpunkt den stärksten Wachstumsreiz entfaltete, fanden sich schon nach 12 Std Werte, die die Kontrollen erst nach 36 Std erreichten. Die Wirkung von N-Acetylglutaminsäuredinitril auf die Stoffwechselvorgänge welche der Regeneration zugrunde liegen, ist somit schon nach 12 Std (wahrscheinlich aber noch früher) nach Beginn der Einwirkung voll ausgeprägt.

Zusammenfassung

Aus den Versuchen darf man schließen, daß die Dinitrile, soweit sie die Nervenregeneration anregen, allgemein sehr frühzeitig (etwa 12 Std) nach der Applikation den Nucleoproteinstoffwechsel der Nervenzellen anregen. Diese Wirkung ist flüchtig. Sie ist bei N-Acetylglutaminsäuredinitril von einer hemmenden Wirkung gefolgt, wenn das Dinitril über Tage (> 24 Std) auf die Nervenzelle in annähernd gleicher Konzentration einwirkt.

Literatur

[1] Bammer, H.: Z. Zellforsch. **43**, 64 (1955). — [2] Bammer, H., u. W. Hoppe: Helvet. physiol. Acta **12**, C 49 (1955). — [3] Bammer, H., u. V. Martini: Pflügers Arch. **257**, 255 (1953). — [4] Bammer, H., u. A. von Muralt: Pflügers Arch. **258**, 90 (1953); **260**, 216 (1955). — [5] Hintzsche, E.: Z. mikrosk.-anat. Forsch. **60**, 75 (1953). — [6] Hydén, H.: Symposia Soc. Exper. Biol. **1**, 152 (1947). — [7] Hydén, H., u. H. Hartelius: Acta psychiatr. (Copenh.), Suppl. 48 (1948). — [8] König, M. P.: Helvet. physiol. Acta **11**, 329 (1953). — [9] Martini, V., u. J. Pattay: Helvet. physiol. Acta **10**C, 18 (1952). — Arch. internat. Pharmacodynamie **99**, 314 (1954).

Dr. H. Bammer, Bern (Schweiz), Hallerianum
z. Zt. Dept. of Neurology, McGill University, 3801 University Street,
Montreal 2, Qué./Canada

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 474—480 (1956)

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering AG Berlin-West

17-α-Oxyprogesteron und Nebennierenrindenhyperplasie

III. Mitteilung

Von

H. Langecker

(Eingegangen am 28. November 1955)

Auf dem von ACTH abhängigen Weg der Corticosteroidsynthese über Cholesterin hat 17-α-Oxyprogesteron (I) eine Schlüsselstellung (Hechter, Dorfman). Bei der Nebennierenhyperplasie nimmt man heute eine Störung im 11-21-Hydroxylasesystem der Nebenniere an derart, daß die Corticosteroidsynthese auf der Stufe des I blockiert ist. Für uns gewann der Abbau des I durch den Nachweis der progestativen Wirkung seines 17-α-Capronats (Junkmann) an Interesse.

Wir hatten bei 2 männlichen Individuen nach i. m.-Verabreichung von 1 g I unverändertes I nur in Spuren, hingegen die beiden Reduktionsprodukte Pregnan-3,17-diol-20-on (II), Pregnan-17,20-diol-3-on (III) und vor allem 3,17,20-Pregnantriol (IV) in einer Gesamtausbeute von etwa 10% der Eingabe im Harn nachweisen können (I. u. II. Mitt.). Auch bei unbelasteten Individuuen findet man (II) und (IV) im Harn (Tab. 1), II allerdings in sehr kleinen Mengen. Unsere Normalwerte für (IV) stimmen mit denen von Cox überein.

Es interessierte zunächst festzustellen, in welchem Organ die Reduktion zu erwarten ist. Nach zahlreichen Untersuchungen mit Leberschnitten und -brei scheint der Hauptreduktionsort der Corticosteroide in der Leber zu liegen. Eine bei Dorfman zitierte Mitteilung von Levy, die mir bisher im Original nicht zugänglich war, besagt, daß die Reduktion von I zu Δ^4-Pregnen-17-α-20-β-diol-3-on auch in der Nebenniere möglich ist, obwohl doch die Hauptaufgabe der Nebenniere die Oxydation von I zu Corticosteroiden ist.

Wir haben daher untersucht, wie I durch Rattenleberhomogenate verändert wird.

Methodik

Bezüglich der Bestimmung von I, II, III, IV und 17-Ketosteroide (V), vgl. 2. und 3. Mitt.*: 2,5 g frische Rattenleber wird mit 10 cm³ 0,15 m KCl und 20 cm³ 0.15 m Phosphatpuffer p_H 7,3 unter eventuellem Zusatz von 12 mg Citronensäure

* Die Bestimmung des durch Kaliumperjodatoxydation entstandenen Acetaldehyds gestattet nicht, zwischen Pregnanen und Pregnenen zu unterscheiden; es bleibt auch die Zuordnung zur Allo- oder Normalreihe sowie die Stellung der Hydroxylgruppen offen.

und 165 mg Nicotinsäureamid homogenisiert und mit 5 mg I 2 Std bei 37° unter Rühren inkubiert. Das Inkubat wurde mit 100 cm³ abs. Alkohol gefällt und der nach Abzentrifugieren gewonnene Extrakt bei 50° im Vakuum eingeengt, hernach in 100 cm³ Wasser aufgenommen, 6mal mit 30 cm³ frisch destilliertem Chloroform extrahiert. Der trübe Chloroformextrakt wurde einmal mit $^1/_{10}$ Vol 1 n-Natronlauge, 3mal mit $1/_{10}$ Vol Wasser gewaschen und im Vakuum eingeengt, der Rückstand in 30 cm³ Benzol aufgenommen; der Benzolextrakt wurde in der gleichen Weise wie der Chloroformextrakt gewaschen und nach dem Einengen in Alkohol aufgenommen. Die Bestimmung von II, III und IV wurde in aliquoten Teilen ausgeführt. In Zusatzversuchen mit 5 mg IV wurden 60—90% wiedergefunden. Leberhomogenat, das mit dem gleichen Zusatz von I 90 min im kochenden Wasserbad gehalten wurde, ergab kein IV. Der Leberleerwert betrug 0,12 bis 0,25 mg IV.

Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 2 zusammengestellt. Man ersieht daraus, daß die Leber I zu IV reduziert. II trat nicht auf, V nur in Spuren. Die Befunde sind nicht überraschend, da TAYLOR bei Inkubation von Progesteron mit Kaninchenleber neben Pregnan-3 bzw. 20-Ketonen auch Pregnan-3α,20α-diol fand und HUEBENER als Hauptprodukt beim Bebrüten von REICHSTEIN S mit Leberhomogenaten Δ_4-Pregnen-triol (17α, 20α, 21)-on(3). Es verhält sich I im reduktiven Abbau ähnlich wie Progesteron.

Tabelle 1. *Ausscheidung von 17-Ketosteroiden, 3,17,20-Pregnantriol, 17-Oxyprogesteron, Pregnan-3,17-diol-20-on, Pregnan-17, 20-diol-3-on*
(In Klammern Anzahl der Versuche)

Fall Nr.	Geschlecht	Alter Jahre	Diagnose	17-Ketosteroide	3,17,20-Pregnantriol mg/Tag	17-Oxy-Progesteron	Pregnan-3,17-diol-20-on	Pregnan-17,20-diol-3-on
1	♂	50	normal	18,3	1,5 ± 0,118 (12)	< 0,04 (12)	0,47 ± 0,077 (6)	
2	♂	31	normal	18,0 ± 1,35 (6)	2,61 ± 0,44 (6)	0,14 ± 0,083 (4)	0,25 ± 0,022 (5)	
3	♀	24	Hypophysen-zwischenhirn-schädigung . .	13,3	2,97		0,31	
4	♀	12	Turner-Syndrom .	3,0	0,74		0,07	
5	♀	15		5,44	1,28		0,05	
6	♀	30	Hirsutismus	13,4	1,84		0,2	
7	?	11	NN-hyperplasie . .	91,5 ± 13 (7)	24,1 ± 4,1 (7)	0,4 (5)	4,9 ± 1,0 (6)	2,34 ± 1,0 (5)
8	♀	28	NN-Ca	150,0 ± 30,0 (4)	6,7 ± 0,43 (6)	0,09	0,67 ± 0,05 (3)	0,4

Tabelle 2. *Oxyprogesteronabbau durch Leberhomogenate*
(In Klammern Zahl der Versuche)

Nr.	Zusätze	Pregnantriol in Prozenten des vorgelegten Oxyprogesterons
I	Ohne	9,5 ± 1,25 (3)
II	Ascorbinsäure + Citronensäure	11,3 ± 1,13 (11)
III	Nicotinsäureamid + Citronensäure	10,7 ± 0,57 (7)

Diskussion

Wenn bei der Nebennierenhyperplasie die Enzymentgleisung die I-Oxydation betrifft, müßte man nach Belastung mit I ein ähnliches Bild an Metaboliten im Harn erwarten, wie bei der Hyperplasie. Allerdings könnte zugeführtes I im Stoffwechsel sich anders verhalten als endogen auftretendes, das ja in viel höheren Konzentrationen der Nebenniere angeboten wird. Tatsächlich entsprechen die im Harn bei Belastung mit I auftretenden Metabolite denen bei der Hyperplasie. So findet man die Reduktionsprodukte von I gegenüber der Norm vermehrt. Mason[1] konnte bei einem Fall in den Rohglykosiden große Mengen von II nachweisen (vgl. auch Liebermann sowie Ruppert). Wir haben bei Fall 7* der Tab. 1 I, II, III und IV gefunden. Die IV-Ausscheidung sowie die der V ließen sich durch Cortison vermindern (vgl. auch Bonngiovanni 2). Dagegen blieb im Falle 8 der Tab. 1 (Carcinom) nach Cortisonbehandlung sowohl V- wie IV-Ausscheidung unbeeinflußt.

Die V-Ausscheidung ist in manchen Fällen von Nebennierenhyperplasie stark erhöht. Bei einem Fall von kongenitaler Nebennierenhyperplasie mit einer Tagesausscheidung von 300 mg V konnte Gardner auch die entsprechende Erhöhung des Plasmaspiegels nachweisen (360 γ% gegenüber 74 in der Norm). In Tab. 3 sind Literaturangaben und unsere eigenen Befunde bezüglich IV- und V-Ausscheidung zusammengestellt. Für die Beurteilung der IV-Werte ist die angewendete Methodik zu beachten.

Segaloff fand bei der Pregnandiolbestimmung nach Sommerville-Marrian (HCl-Hydrolyse) in Fällen von virilisierender Nebennierenhyperplasie mit erhöhten V auch stark vermehrte „Pregnandiolchromogene". Er nimmt an, daß bei diesem Vorgehen IV miterfaßt wird, was gut damit übereinstimmt, daß diese Chromogene durch Cortison-Behandlung herabgesetzt werden. Wir haben bei einer Nebennierenhyperplasie (Fall 7 der Tab. 1) auch Pregnandiolwerte von 30 mg gefunden, allerdings nur bei HCl-Hydrolyse, während Hydrolyse mit Glucuronidase normale Werte ergab. Es scheinen demnach Hydrolyse Artefakte zu sein, die hier mitbestimmt werden. Wie aus den Untersuchungen von Klopper hervorgeht, ist die

* Für die freundliche Überlassung der Harnproben danken wir der Leitung der I. Medizin. Klinik des Städtischen Krankenhauses Berlin-Moabit, Herrn Prof. Dr. H. Bartelheimer, sowie der Chefärztin der Neurolog.-Psychiatrischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses Berlin-Neukölln, Frau Dr. Lange.

Schwefelsäurereaktion für Pregnandiol nicht spezifisch. Er entfernt aus IV entstandene Artefakte durch Kaliumpermanganatbehandlung und gelangt über Chromatographie der Acetylierungsprodukte zu einer wesentlich spezifischeren Pregnandiol-Bestimmung. Nach unseren Erfahrungen geben Pregnan-21-ol-3,20-dion und Pregnan-3α-20β-21-triol, $C_{21}H_{36}O_3$, Mol. Gew. 336,5, Schmelzpunkt

Tabelle 3. *17-Ketosteroid- und Pregnantriolausscheidung bei Nebennierenhyperplasie*

Autor	Methode	Jahre u. Geschl.	17-Keto-Steroide	„Pregnantriol"	Verhältnis 17-Keto/Pregnantriol
			mg/Tag		
Bongiovanni[1] . . .	„Pregnandiol" 440 mμ	4w	13,3	4,91	2,7
		3w	7,9	4,1	1,9
Bongiovanni[2] . . .		7/12w	2,1	10,3	0,2
		3w	3,4	17,6	0,19
		6m	5,6	17,0	0,33
		3w	8,6	5,4	1,6
		4m	12,7	38,6	0,33
		3w	15,0	4,9	3,0
		8m	18,0	2,4	7,5
		6m	19,0	13,9	1,3
		9w	24,0	5,8	4,1
		13m	24,0	34,0	0,7
		16w	26,0	77,0	0,33
		30w	29,0	42,0	0,69
Segaloff	„Pregnandiol-Chromogene"	17w	47,3	28,9	1,6
		10w	28,9	10,8	2,5
Sommerville und Marrian		9w	17,2	18,5	0,93
		5w	25,7	3,5	7,3
		17w	96,2	198,5	0,48
Mason[2]	isolierte Steroide*		153,0	31,0	5,0
			209,0	74,0	2,8
Miller.	isolierte Steroide*	14w	13,6	8,0	1,7
Langecker**	Acetyldehyd	11?	91,5	24,1	3,8

* Die Werte beziehen sich auf die Aufarbeitung mehrerer Tagesportionen.

205/06—09°, $M_D = +90{,}18$ (Alkohol)*, auch die Schwefesäurereaktion, wobei die Intensität der Farbe etwa 10 bzw. 75% der Pregnandiolfarbe entsprach.

Bongiovanni[1] gelang es, durch Trennung mit dem Beckmannschen DU-Quarz-Spektrophotometer bei der Farbreaktion der Pregnandiolfraktion mit konz. Schwefelsäure, die Wellenlänge von 440 mμ dem IV zuzordnen. Er nimmt an, daß

* Die Substanz wurde in der Abteilung des Herrn Dr. M. Schenck von Herrn Dr. K. H. Pawlowski hergestellt.

** Die Tagesausscheidung von Dehydroisoandrosteron (Pettenkofer-Chromogene in der Digitoninfällung der Ketonfraktion) betrug 3,0 mg, die der FSH 232 ME.

die erhöhten Pregnandiolwerte, die er bei der Nebennierenhyperplasie fand, zum großen Teil dem IV entsprechen. Allerdings läßt die vorangegangene Säurehydrolyse Artefakte nicht ausschließen. Die Methode von Klopper würde hier Klarstellung bringen können. Wir haben IV nach Perjodsäureoxydation als Acetaldehyd bestimmt. Neuerdings empfiehlt Bongiovanni[3] eine chromatographische Trennung über eine Al-Säule für die Bestimmung von IV.

Aus der Tab. 3 ersieht man, daß sich die Fälle gruppieren lassen in solche, bei denen die V-Ausscheidung größer als die IV-Ausscheidung ist (16 von 24 Fällen) und solche mit umgekehrter Relation (8 von 24 Fällen), wobei die Höhe der V-Ausscheidung nicht entscheidend ist.

Bei 2 Fällen von Nebennierenhyperplasie, die cortisonempfindlich waren, hatten wir eine Tagesausscheidung von 60,0 bzw. 45,0 mg V und 2,5 bzw. 2,0 mg IV gefunden. Die sich ergebende Relation von 24 bzw. 22,5 ist bestimmt überhöht, denn die IV-Bestimmung erfolgte mit schwacher Säurehydrolyse, Bedingungen, unter denen nur etwa $^1/_5$ der IV-Werte erfaßt wird. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache würden die beiden Fälle eine ähnliche Relation ergeben, wie Fall 7 der Tab. 2.

Ein Versuch, die beiden Stoffwechsellagen zu deuten, ergibt:

Ein Überwiegen der IV-Ausscheidung über die von V würde im Sinne vermehrter Reduktion von I sprechen, wie sie auch bei normalen Personen unter I-Belastung zu beobachten ist. Hingegen besteht im anderen Fall ein Unterschied gegenüber I-Belastung, konnten wir doch nach i. m.-Verabreichung von 1,5 bzw. 1,0 g I bei gesunden männlichen Versuchspersonen (1. u. 2. Mitteilung) keine deutlich erhöhte V-Ausscheidung nachweisen. Die relativ hohe Ausgangslage (17—20 mg je Tag) könnte geringfügige Zunahmen (unter 5%) verdeckt haben. Zur Entscheidung wären Versuche an hypogonadalen Individuen auszuführen. Daß auch bei I-Belastung V gebildet werden, geht aus Beobachtungen von Fukushima bzw. Polley hervor. — Fälle von Nebennierenhyperplasie unter Belastung mit I zeigen, wie im Fall von Bongiovanni[2] bevorzugte Reduktion oder, wie im Falle von Jailer, eine beachtliche Oxydation des I. Auch unter I-Belastung lassen sich 2 verschiedene Stoffwechsellagen erkennen.

Von den beiden Formen der Nebennierenhyperplasie erklärt sich die mit erhöhter IV-Ausscheidung einfach mit der heute von den meisten Autoren vertretenen Ansicht der Corticosteroidsynthese-Blockade auf der I-Stufe. Auch der fehlende Anstieg der Blutcorticosteroide nach ACTH-Verabreichung zeigt die Schwierigkeiten bei der Synthese (Christy). Man muß erwarten, daß das sezernierte I statt zu Corticosteroiden verändert zu werden, seinen reduktiven Abbau in der Leber erfährt. Bei Fällen von Nebennierenhyperplasie mit gegenüber IV erhöhter V-Ausscheidung muß man eine zusätzliche Störung annehmen. Es ist sehr wahrscheinlich, daß aus I in der Nebenniere V gebildet werden. Dagegen spricht zwar, daß bei Belastung mit I normale Individuen kaum

erhöhte V-Ausscheidung zeigen. Allerdings werden der hyperplastischen Nebenniere andere Konzentrationen angeboten. Dafür, daß solche Fermente vorkommen, spricht die Tatsache, daß SAMUELS I als Intermediärprodukt der Testosteronsynthese im Hoden erkannt hat. Für einen Zusammenhang zwischen I und V spricht auch, daß bei der Nebennierenhyperplasie nach ACTH-Zufuhr die IV und V-Ausscheidung gesteigert bzw. durch Cortison unterdrückt wird (BROOKS, BARTTER, BIERICH). Man kann aber auch nach der Ansicht von DORFMAN einen eigenen Corticoidsyntheseweg aus Acetat über Dehydroepiandrosteron zur Deutung heranziehen, der auch durch Cortison gehemmt werden müßte.

Die Nebennierenhyperplasie läßt sich als ein Korrekturversuch einer Fermentblockade von der Hypophyse her ansehen, ähnlich wie es für die Schilddrüsenhyperplasie nach Thiouracilblockade zutrifft. Die differenten Stoffwechsellagen der hyperplastischen Nebenniere äußern sich im Auftreten von 2 verschiedenen Typen. Für die Diagnosestellung wird die Beachtung der IV-Ausscheidung ebenso wichtig sein wie die der V-Ausscheidung.

Summary

In continuation of the investigations on 17-alpha-oxyprogesterone (I), the reduction products of I in normal individuals were examined.

Experiments with liver-homogenates with addition of I revealed that the liver participates in this reduction. After administration of I the urinary metabolites were compared, also in cases of adrenal hyperplasia, where a blockage of corticosteroid synthesis is assumed in the I phase. The results show a grouping of the cases according to the ratio of Pregnantriol-(IV)-/17-ketosteroid-(V) excretion. Those cases where the excretion of IV is the greater are like those after administration of I. An additional disturbance is discussed for those cases, in which the excretion of V outweighs that of IV, and the diagnostic importance of the Pregnantriol excretion is pointet out.

Fräulein RENATE LENDORFF hat bei der Arbeit wertvolle Hilfe geleistet.

Literatur

BARTTER, F. C., F. ALBRIGHT, A. FORBES, A. LEAF, E. DEMPSEY and E. CAROLL: J. Clin. Invest. **30**, 1237 (1951). — BIERICH, J. R., E. BOHE u. KL. D. VOIGT, Acta Endocrinol. **18**, 512 (1955). BONGIOVANNI[1], A. M.: Bull. Johns Hopkins Hosp. **92**, 244 (1953). — BONGIOVANNI[2], A. M., u. Mitarb.: J. Clin. Endocrin. **14**, 409 (1954.) — BONGIOVANNI[3], A. M. and G. W. CLAYTON: Bull. John Hopkins Hosp. **94**, 180 (1954). — BROOKS, R. V.: J. Endocrinol **12**, IV (1955). — CHRISTY, N. P., E. Z. WALLACE and J. W. JAILER: J. Clin. Invest. **34** 899 (1955). — COX, R. I., and G. F. MARRIAN: Biochemic. J. **54**, 45 (1953). — DORFMAN, R. I.: zit. nach OERTEL, G., u. H. HEIN: Arzneimittel-Forsch. **5**, 531 (1955).

— Hechter, O., u. Mitarb.: Recent Progr. in Hormone Res. **6**, 215 (1951). — Hübener, H. J., and J. Schmidt-Thomé: Hoppe-Seylers Z. **299**, 240 (1955). — Jailer, J. W.: Bull. New York Acad. Med. **29**, 377 (1953). — Fukushima, D. K., K. Dobriner and T. F. Gallagher: Federat. Proc. **10**, 185 (1951). — Gardner, L. I.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. **83**, 251 (1953). — Junkmann, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 244 (1954). — Klopper, A., E. A. Michie and J. B. Brown: J. Clin. Endocrin. **12**, 209 (1955). — Langecker, H.: Biochem. Z. **325**, 16 (1953). — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 306 (1954); **225**, 309 (1955). — Levy, H., u. Mitarb.: (zit. nach R. I. Dorfman and Fr. Ungar: Metabolism of Steroid Hormones. Minneapolis: Burgess Publish. Co. 1954. — Lieberman, S. and K. Dobriner: J. of Biol. Chem. **161**, 269 (1945). — Mason[1], H. L., and H. S. Strickler: J. of Biol. Chem. **171**, 549 (1947). — Mason[2], H. J. and E. J. Kepler: J. of Biol. Chem. **161**, 235 (1945). — Miller, A. M., and R. I. Dorfman: Biochemic. J. **46**, 514 (1950). — Polley, H. P., and H. L. Mason: J. Amer. Med. Assoc. **143**, 1474 (1950). — Ruppert, F.: Z. klin. Med. **148**, 622 (1951). — Samuels, L. T.: persönl. Mitt. — Segaloff, A., u. Mitarb.: J. Amer. Med. Assoc. **157**, 1479 (1955). — Taylor, W.: Biochim. et Biophysica Acta **15**, 592 (1954). — Biochemic. J. **60**, 380 (1955).

Prof. Dr. Hedwig Langecker, Hauptlaboratorium der Schering AG, Berlin N 65, Müllerstr. 170/172

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 481—487 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Über einen reninartigen Wirkstoff in Arterienextrakten*

Von
H. Dengler

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. September 1955)

Die nach Reizung des zentralen Vagusstumpfes auftretende Blutdrucksteigerung ist von Jimenez-Diaz auf das Freiwerden eines enzymartigen Stoffes aus Arterienwänden zurückgeführt worden, der seinerseits aus dem Plasma den eigentlichen Pressorstoff entstehen lassen soll. In Versuchen am sogenannten „cane partido", bei dem zwischen der proximalen und distalen Körperhälfte keine Gefäßverbindungen mehr bestehen, war die Reizung des zentralen Vagusstumpfes nur dann von einem Blutdruckanstieg auch in der distalen Körperhälfte gefolgt, wenn diese mit Plasma — nicht mit Ringer-Lösung — durchströmt wurde. Schließlich gelang es auch, mit Inkubaten aus Arterienwandextrakten und Plasma beim Hund Blutdrucksteigerungen zu erzielen. In späteren Arbeiten (Jimenez-Diaz 1953) wurde die eingangs dargestellte Auffassung zugunsten einer anderen verlassen, die dem Nor-adrenalin als dem Überträgerstoff der Vasokonstriktorenwirkung in der Gefäßwand die vermittelnde Rolle zuschrieb.

Diese noch unklaren Verhältnisse gaben die Veranlassung zu unseren Untersuchungen. Es interessierte vor allem die Frage, ob neben Noradrenalin, dessen Vorkommen in relativ großen Mengen (etwa 1,2 γ pro Gramm Frischarterie) wir bestätigen können, noch andere — hochmolekulare — gefäßwirksame Stoffe in den Arterienwänden vorkommen, unbeschadet, ob sie bei dem geschilderten Reflexmechanismus eine Rolle spielen oder nicht.

Methodik

a) Darstellung der Arterienwandextrakte. Als Ausgangsmaterial dienten Arterien von frischgeschlachteten Schweinen (Aorta abdom., Aa. femor., iliacae, sacr. med., renales, carotideae, subclaviae). Die Arterienstücke von jeweils 10—20 Tieren wurden nach Abpräparieren des anhängenden Gewebes mit der Schere vorzerkleinert, in flüssige Luft gebracht und im hart gefrorenen Zustand (nach Abrauchen der

* Über einen Teil der Ergebnisse wurde auf der Pharmakologen-Tagung in Saarbrücken 1954 berichtet (Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 150 [1955]).

flüssigen Luft) im Multimix zerkleinert. Das relativ feine Pulver wurde wie üblich zu Azetontrockenpulver verarbeitet. Ausbeute: 25—30% des Frischgewichtes.

Das Azetontrockenpulver wurde mit 10 ml/g gekühlter 2%iger NaCl-Lösung zweimal je 1 Std extrahiert. Die Extrakte wurden mit verdünnter Essigsäure auf p_H 4,2—4,5 gebracht. Dabei fällt ein voluminöser braunroter Niederschlag aus, der abzentrifugiert und verworfen wird. Aus dem Überstand läßt sich das wirksame Prinzip durch 0,5-Sättigung mit Ammoniumsulfat oder Vollsättigung mit NaCl fällen. Bei einer weiteren Fraktionierung zeigte sich, daß es in der zwischen 0,3 und 0,6-Ammoniumsulfatsättigung fallenden Fraktion enthalten ist. Während der nachfolgenden Dialyse fällt nochmals ein brauner Niederschlag aus. Nach Abzentrifugieren diente die überstehende Lösung entweder direkt zur biologischen Untersuchung oder sie wurde gefriergetrocknet und das in 0,9% NaCl gelöste Trockenpulver verwendet.

b) *Papierelektrophorese.* Mit einem Teil der so erhaltenen klaren, gelblich gefärbten Extrakte, die durchschnittlich 0,5 g% Eiweiß enthielten, führten wir Papierelektrophoresen nach der Methode von Grassmann und Hannig durch (Schleicher & Schüll 2043a, Veronalpuffer p_H 8,8, $\mu = 0{,}1$, Eingangsspannung 110 V, Laufzeit 20 Std, Temperatur + 4° C, Färbung mit Amidoschwarz). Die zu Vergleichszwecken verwandten Reninpräparate wurden nach Schales aus Schweinenieren dargestellt.

c) Biologische Testobjekte. 1. Isoliertes Kaninchenohr. Registrierung der Tropfenzahl mit einem Ordinatenschreiber. Durchströmungsflüssigkeiten: Ringer-Lösung (9,0 NaCl, 0,2 KCl, 0,2 $CaCl_2$, 0,1 $NaHCO_3$, 1,0 Glucose ad 1 l).

Schweineplasma. Am besten bewährte es sich, frisches Schweineblut sofort mit einer Lösung von 5,0 g Na-citrat, 40,0 g Glucose, Aqua dest. ad 1000,0 zu gleichen Teilen zu mischen und das durch Zentrifugieren gewonnene Plasma, evtl. nach weiterer Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung, zur Durchströmung zu benutzen.

„Globulin-Lösung." Die aus Schweineplasma zwischen 0,3- und 0,5-Ammoniumsulfatsättigung ausfallende Fraktion wird dialysiert, auf das ursprüngliche Plasmavolumen aufgefüllt und mit NaCl isotonisch gemacht.

2. Rattenblutdruck. Ratten von 200—300 g Gewicht. Urethannarkose (0,7 ml einer 25%igen Lösung/100 g Körpergewicht). Atropin. sulf. 1 mg/kg, als Ganglienblocker Hexamethoniumbromid (Bistrium Squibb) 10 mg/kg. Blutdruckregistrierung mit Hg-Manometer in der A. carotis, Injektion in die kanülierte V. femoralis.

3. Isoliertes Meerschweinchenileum und isolierter Rattenuterus in 20 bzw. 10 ml Tyrode bei 35° C bzw. 29° C.

Ergebnisse

1. Durchströmungsversuche am isolierten Kaninchenohr. Das abwechselnd mit Ringer-Lösung bzw. Plasma durchströmte isolierte Kaninchenohr erwies sich als besonders empfindliches Testobjekt zum Nachweis der Gefäßwirksamkeit von Arterienextrakten. Injiziert man in das mit Ringer durchströmte Präparat 0,1—0,2 ml von solchen Extrakten, so verursacht das keine oder nur eine geringfügige Durchströmungsänderung. Demgegenüber führt die gleiche Extraktmenge nach Umschaltung auf „Plasma- oder Globulin-Durchströmung", die an sich nur eine geringe — vielleicht viskositätsbedingte — Durchflußminderung zur Folge hat, zu einer starken Vasokonstriktion, die mitunter 30 bis 40 min andauert (Abb. 1). Die gefäßverengernde Wirkung des zum

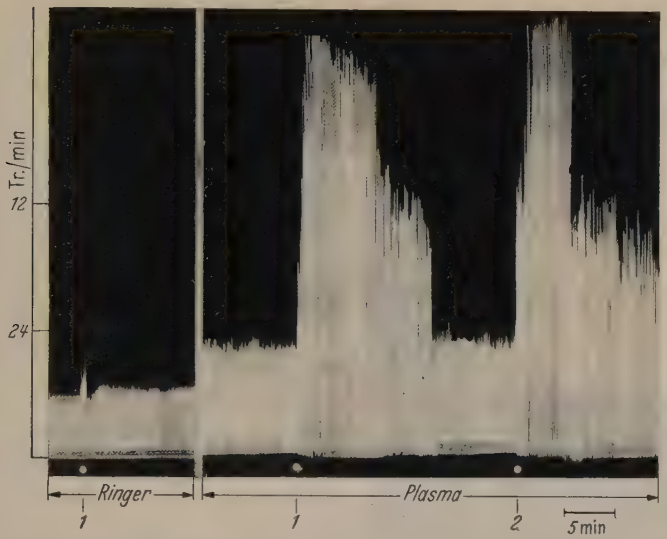


Abb. 1. *Kaninchenohr-Gefäßpräparat.* Abwechselnde Durchströmung mit Ringer-Lösung und Schweineplasma. *1* 0,2 ml Arterienextrakt, *2* 0,1 ml Arterienextrakt

Abb. 2. *Kaninchenohr-Gefäßpräparat.* Abwechselnde Durchströmung mit Ringer-Lösung und Schweineplasma. *1* 0,05 γ Nor-adrenalin, *2* 0,1 ml Arterienextrakt, *3* wie 2, 30 min auf 56° C erhitzt, *4* wie 2, 5 min auf 100° C erhitzt

Vergleich injizierten Nor-adrenalins erfährt in der gleichen Versuchsanordnung keine wesentliche Änderung (Abb. 2).

Dieses Ergebnis spricht dafür, daß der an sich gefäßunwirksame Arterienextrakt ein Prinzip enthält, das bei der Einwirkung auf die Globulinfraktion des Plasma einen gefäßverengernden Stoff entstehen läßt. Das wirksame Prinzip des Extraktes ist, wie schon aus der Methode der Extraktherstellung hervorgeht, nicht dialysabel. Aus der Abb. 2 ist zu entnehmen, daß es hitzelabil ist: nach 30 min langem Erhitzen auf 56° C ist die Wirksamkeit deutlich abgeschwächt, nach 5 min langem Erhitzen auf 100° C nicht mehr nachweisbar.

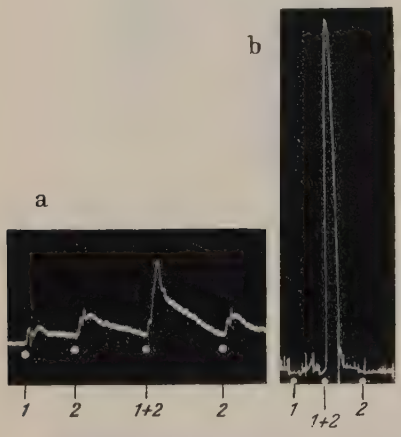


Abb. 3. *Die Wirkung von Arterienextrakt-Plasmainkubaten am Rattenblutdruck und isolierten Rattenuterus.* a) Rattenblutdruck. Intravenöse Injektion von je 0,2 ml folgender Inkubate: *1* 0,5 ml NaCl-Lösung + 2,0 ml Schweineplasma, *2* 0,5 ml Arterienextrakt + 2,0 ml NaCl-Lösung, *1 + 2* 0,5 ml Arterienextrakt + 2,0 ml Schweineplasma; 5 min bei 37° C inkubiert. b) Rattenuterus. 10 ml Tyrodebad. *1* 0,05 ml Plasma, *2* 0,05 ml Arterienextrakt, *1 + 2* 0,05 ml des Gemisches von 1 und 2 zu gleichen Teilen, 5 min bei Zimmertemperatur inkubiert

Wir haben uns bemüht, dieses Ergebnis durch Inkubationsversuche zu stützen. Wir ließen Arterienextrakte auf Plasma bzw. Globulinlösungen in verschiedenem Mengenverhältnis 3 bis 30 min lang bei 37° C einwirken, inaktivierten dann durch 5 min langes Erhitzen auf 100° C und injizierten das Filtrat. Die Durchführung dieser Versuche erwies sich als schwierig, da auch die ohne Arterienextrakt bei 37 °C gehaltenen, nur Plasma bzw. Globuline enthaltenden Kontrollansätze schon nach kurzer Zeit vasokonstriktorisch wirksam wurden. Immerhin ließ sich in mehreren Versuchen zeigen, daß die mit Arterienextrakt inkubierten Proteinlösungen deutlich wirksamer waren.

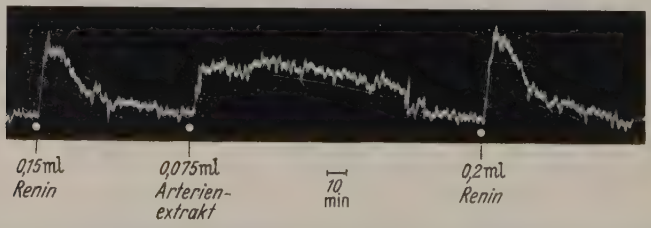


Abb. 4. *Pressorische Wirkung des Arterienextraktes.* Ratte 200 g, Urethannarkose. 1 mg/kg Atropin. sulf., 10 mg/kg Hexamethoniumbromid i.v., Zeit in Minuten

2. Versuche am isolierten Meerschweinchendarm und Rattenuterus. Eine ähnliche Schwierigkeit ergab sich bei Versuchen am isolierten Darm, indem schon die reinen Plasma- bzw. Globulinlösungen nach mehr

oder weniger langer Aufbewahrung bei 37° C darmerregend wirkten. Die mit Arterienextrakt inkubierten Lösungen waren jedoch meistens deutlich wirksamer. Die Wirkung ist atropinresistent. Besonders eindeutig ließ sich das in Versuchen am Rattenuterus zeigen, in denen die Inkubation des Arterienextraktes mit Plasma nicht bei 37°, sondern bei Zimmertemperatur erfolgte. Unter diesen Bedingungen waren die

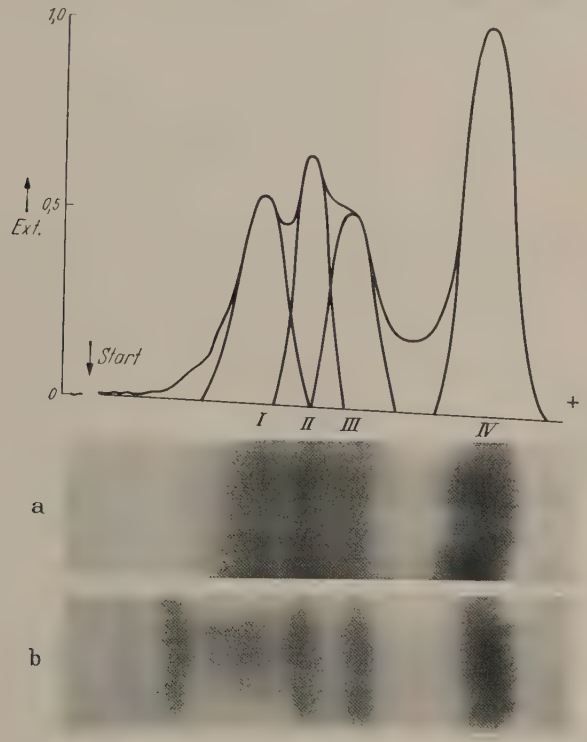


Abb. 5. *Elektrophorese-Diagramm* (siehe Methodik). *a* Arterienextrakt, *b* Schweineplasma

Kontrollansätze praktisch wirkungslos, während die Inkubate starke Uteruskontraktionen hervorriefen (Abb. 3 b).

3. Blutdruckversuche. An der narkotisierten Ratte können die Arterienextrakte bei intravenöser Injektion zu starken und langdauernden Blutdrucksteigerungen führen, die in ihrer Form den durch Renin verursachten vergleichbar sind (Abb. 4). Auch Inkubate mit Plasma- oder Globulinlösungen erwiesen sich als pressorisch wirksam. Die pressorische Wirkung der Extrakte bzw. der Inkubate ließ sich jedoch nicht regelmäßig nachweisen. Es zeigte sich wiederholt, daß auch solche Ansätze, die am Kaninchenohr starke Vasokonstriktionen verursachten, am Blutdruck unwirksam waren.

Ein bemerkenswerter Unterschied scheint zwischen dem gefäß- und blutdruckwirksamen Faktor der Arterienextrakte und dem aus Nieren gewonnenen „Renin" zu bestehen. Reninpräparate, die in der betreffenden Dosierung die gleiche oder sogar eine schwächere Wirkung am Gefäßpräparat ausübten wie eine bestimmte Menge Arterienextrakt, waren am Blutdruck stets viel wirksamer als dieser.

4. Papierelektrophoretische Untersuchungen. Die nach der angegebenen Methode gewonnenen Elektrophoresediagramme der Arterienextrakte lassen 4 Fraktionen erkennen. Bei einem Vergleich mit dem Elektrophoresediagramm des Schweineplasmas fällt die große Ähnlichkeit auf (Abb. 5). Die am weitesten anodisch gewanderte Fraktion des Arterienextraktes entspricht in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit dem Plasmaalbumin.

Bemerkungen zu den Ergebnissen

Das wesentliche Ergebnis unserer Untersuchungen ist, daß in Extrakten aus Arterienwänden ein Faktor enthalten ist, der — an sich pharmakologisch unwirksam — durch Zusammenwirken bzw. Inkubation mit Plasma einen auf die glatte Muskulatur der Gefäße, des Darmes und Uterus erregend wirkenden Stoff entstehen läßt. Die Tatsache, daß das Plasma sich durch seine Globulinfraktion als Substrat ersetzen läßt, schließt eine irgendwie geartete Mitwirkung korpuskulärer Elemente des Blutes und etwa in ihnen vorkommender Wirkstoffe — z. B. des Serotonins — aus. Die nächstliegende Deutung wäre, daß der mit Ammonsulfat fällbare, nicht dialysierbare und thermolabile Wirkstoff der Arterienextrakte ein Ferment ist, das aus einem in der Globulinfraktion des Plasmas enthaltenen Protein den eigentlich wirksamen Stoff abspaltet. Dieser entspricht mit seiner Gefäß-, Darm- und Uteruswirksamkeit anderen bekannten pharmakologisch wirksamen Polypeptiden, z. B. dem Hypertensin, Pepsitensin, Bradykinin, die sich aus dem gleichen Substrat, nämlich den Plasmaglobulinen unter der Einwirkung proteolytischer Fermente bilden.

Von besonderem Interesse erscheint die Frage, ob der Wirkstoff der Arterienextrakte mit dem *Renin* aus Nierenextrakten identisch ist, zumal auch für dieses *vaskuläre* Elemente als Bildungsstätte angenommen werden. Diese Frage müßte wenigstens vorläufig verneint werden, da auf Grund unserer bisherigen Ergebnisse charakteristische Unterschiede zwischen den beiden Wirkstoffen zu bestehen scheinen: Renindosen, die am *Kaninchenohr* schwächer wirkten als Arterienextrakte, übertrafen diese am *Rattenblutdruck* an pressorischer Wirkung. Sodann ließ sich die Wirkung der Arterienextrakte im Gegensatz zu derjenigen des Renins nicht durch Cocain verstärken.

Für die Frage nach der physiologischen oder auch pathophysiologischen Bedeutung des in Arterienwänden nachgewiesenen fermentartigen

Wirkstoffes könnte sodann das Ergebnis der elektrophoretischen Untersuchung der Extrakte aufschlußreich sein: das Diagramm des Arterienextraktes stimmt weitgehend mit demjenigen des Plasmas überein. Wenn das auch keine Identität der einzelnen Komponenten bedeutet, so weist es doch auf die Möglichkeit hin, daß einzelne Fraktionen der Plasmaproteine auch in der Gefäßwand vorkommen, unter ihnen vielleicht das Substrat für den Wirkstoff des Arterienwandextraktes. Dadurch könnte der vasokonstriktorische Stoff in der Gefäßwand selbst entstehen.

Zusammenfassung

Extrakte aus Arterienwänden enthalten einen mit Ammoniumsulfat fällbaren, nicht dialysablen, thermolabilen Faktor, der — an sich unwirksam — im Zusammenwirken mit der Globulinfraktion des Plasmas einen Stoff entstehen läßt, der vasokonstriktorisch sowie darm- und uteruserregend wirkt.

Gegen eine Identität mit Renin, das einen ähnlichen Wirkungsmechanismus besitzt, sprechen mehrere Befunde.

Die Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft ausgeführt.

Literatur

De la Barreda, P., C. Jimenez-Diaz y A. F. Molina: Rev. espaň. Cardiol. **1**, 1 (1947), zit. n. Jimenez-Diaz. — De la Barreda, P., A. F. Molina y C. Jimenez-Diaz: Bull. Inst. Med. Univ. Madrid **1**, 53 (1948), zit. n. Jimenez-Diaz. — De la Barreda, P., A. F. Molina, R. Alcala y C. Jimenez-Diaz: Bull. Inst. Med. Res. Madrid **5**, 65 (1953). — Grassmann, W., u. K. Hannig: Z. physiol. Chem. **290**, 1 (1952). — C. Jimenez-Diaz, De la Barreda y A. F. Molina: Rev. clin. espaň. **24**, 417 (1947), zit. n. Jimenez-Diaz. — Jimenez-Diaz: Schweiz. med. Wschr. **1948**, 920. — Schales, O.: J. Amer. Chem. Soc. **64**, 561 (1942).

Dr. H. Dengler, Heidelberg, Ludolf Krehl-Klinik

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 488—496 (1956)

Aus der Hautklinik der Justus Liebig Hochschule Gießen
(Direktor: Prof. Dr. R. M. Bohnstedt)

Einwirkung des Megaphens auf allergische Phänomene im Tierexperiment

Von

R. M. Bohnstedt und W. Lanz

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. Dezember 1955)

Pirquet faßte den Begriff der Allergie sehr weit, indem er nur von „Andersempfindlichkeit" sprach. Seine Auffassung wurde dann durch die Theorie der Antigen-Antikörper-(Allergen-Reagin)bildung, die in den Mittelpunkt des allergischen Geschehens gestellt wurde, bis zu einem gewissen Grade eingeengt. Doch erweist es sich immer wieder, daß man — und dies gilt besonders für das Ekzem, welches man allgemein als eine allergische Hautkrankheit auffaßt — nicht bei jeder allergischen Krankheit eindeutig die Bildung von Antikörpern nachweisen kann. Aus diesem Grunde unterscheidet Letterer neuerdings zwischen einer anaphylaktischen Allergie, bei der sich eine Antigen-Antikörperreaktion abspielt, und einer dysregulativen, die auf einer vasculären, hormonalen oder neuralen Störung beruht. Zu den Phänomenen der dysregulativen Allergie rechnet Letterer das Ekzem und auch das Schwartzman-Sanarelli-Phänomen.

Daß beim Zustandekommen des Ekzems auch nervale Vorgänge eine Rolle spielen, geht sowohl aus klinischen Beobachtungen (Kreibich, Bohnstedt u. Eichert), als auch aus den experimentellen Untersuchungen am Tier hervor.

Unter letzteren seien die Versuche Storcks hervorgehoben. Bei Sensibilisierungsversuchen mit Dinitrochlorbenzol an der Haut von Meerschweinchen konnte Storck zunächst feststellen, daß der Sensibilisierungsvorgang mit Gaben von ganglienblockierenden Substanzen — Storck verabreichte Pendiomid — verhindert bzw. verzögert wird. Storck baute dann die Versuche weiter aus und stellte in Gemeinschaft mit Koella fest, daß nach Entfernung der periarteriellen Nervengeflechte der Arteria femoralis am Meerschweinchen, oder nach Exstirpation des lumbalen Grenzstranges beim Kaninchen die ekzematöse Sensibilisierung gegen das Dinitrochlorbenzol noch deutlicher verzögert, in den meisten Versuchen sogar ganz verhindert wurde.

Es war naheliegend, die Untersuchungen Storcks zu modifizieren. Wir verwandten statt des ganglienblockierenden Mittels Pendiomid das

auf das zentrale und vegetative Nervensystem wirkende Megaphen[1] (Mph) und suchten zu eruieren, ob und inwieweit das Mph imstande ist, die durch das Dinitrochlorbenzol (DNCB) hervorgerufene Sensibilisierung zu beeinflussen. Darüber hinaus interessierte uns die Frage, ob das Mph auch andere allergische Phänomene zu beeinflussen imstande ist. Die Fragestellung der Arbeit war somit folgende:

1. Bewirkt Megaphen eine Änderung der Sensibilisierung an der mit DNCB vorbehandelten Haut von Meerschweinchen?

2. Hat Megaphen einen Einfluß auf das Schwartzman-Sanarelli-Phänomen?

3. Beeinflußt das Megaphen durch Fremdeiweiß und Macrodex hervorgerufene hyperergische Reaktionen?

Versuchstechnik und Vorversuche

1. Sensibilisierung der Haut von Meerschweinchen mit DNCB. *Versuchstechnik:* Enthaarung der Rückenhaut mit Bariumsulfid bzw. Pilca-Creme. 4—5 Tage danach, nach völligem Abklingen einer eventuellen Reizung durch die Depilation, Auftropfen und Einreiben einer 5%igen DNCB-Lösung mittels Läppchen auf einen etwa 5 × 5 cm großen Hautbezirk (Dosierung etwa 30 Tropfen). Ergebnis: Nach einigen Tagen trat in diesem Bereich Schwellung, Rötung, Schuppen- und Krustenbildung auf. Die Tiere kratzten sich, was für einen sie plagenden Juckreiz sprach. Nach 2—3 Wochen pflegte diese Reaktion abzuklingen.

Nach Abklingen der genannten Erscheinungen, also nach 2—3 Wochen, erneutes Einreiben des gleichen Hautbezirkes mit ¼%igem DNCB, wiederum 30 Tropfen. Ergebnis: 2—3 Tage nach der Einreibung Entstehen einer in der Regel noch heftigeren, über den eigentlichen Bezirk hinausgehenden ekzematoiden Reaktion.

Vorversuche: In 20 Vorversuchen konnten wir uns von der Möglichkeit einer solchen künstlichen Erzeugung einer ekzemartigen Reaktion an der Meerschweinchenhaut überzeugen. In weiteren Vorversuchen erkannten wir, daß eine einmalige Applikation von DNCB ¼%ig nicht ausreicht, um eine sichtbare Hautreaktion beim Meerschweinchen auszulösen. Wir glauben deshalb, daß es sich bei der nach Vorbehandlung der Tiere mit 5%igem DNCB beobachteten Veränderung der Haut auf ¼%iges DNCB in der Tat um eine ekzematoide, auf Sensibilisierung beruhende Reaktion handelte. Allerdings zeigte es sich, daß diese Reaktion nicht immer voll zur Entfaltung kam, wie es ja überhaupt schwierig ist, an der Haut von Tieren Dermatosen, speziell Ekzeme zu erzeugen.

2. Schwartzman-Sanarelli-Phänomen (SS). *Versuchstechnik:* Das SS-Phänomen wurde an Kaninchen wie folgt ausgelöst: Intradermale Injektion von 0,1 cm³ Meningokokkenaufschwemmung in die Bauchhaut[2]. 24 Std später 1,0 der gleichen Aufschwemmung i.v. Bei Verwendung dieser Aufschwemmung trat an der Bauchhaut nur eine geringfügige unspezifische Lokalreaktion ein und nach der intravenösen Injektion dort — d. h. am Ort der ersten Injektion — eine urticarielle Reaktion, unter Umständen eine hämorrhagische Nekrose.

[1] Megaphen = Dimethylaminopropyl-3-Chlor-Phenothiazin (Chlorpromazin).

[2] Wir verwendeten eine uns liebenswürdigerweise von den Behring-Werken, Marburg, überlassene Meningokokkenaufschwemmung.

Vorversuche: Mehrere Vorversuche überzeugten uns, daß das SS-Phänomen jeweils auslösbar war.

3. Die Hyperergie gegenüber Hühnereiweiß und Macrodex. *Versuchstechnik:* Die Hyperergie gegen Hühnereiweiß und Macrodex (Macrodex ist eine 10%ige Lösung von makromolekularer Polydextrose = Dextran-Hydrolysat) wurde mittels des sogenannten Pfötchenphänomens (Selye) an Ratten geprüft. Das Phänomen wurde durch intraperitoneale Zufuhr von frischem Hühnereiweiß oder Macrodex hervorgerufen. Etwa 1 Std post injekt. von Macrodex und Hühnereiweiß traten bei

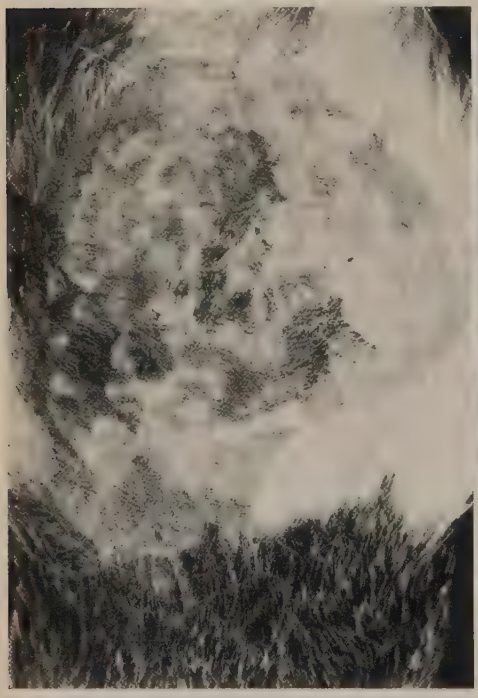


Abb 1

Abb. 2

Abb. 1. Ekzematoide Reaktion auf der Rückenhaut von Meerschweinchen nach Sensibilisierung mit DNCB; (schwache Reaktion)

Abb. 2. Ekzematoide Reaktion auf der Rückenhaut von Meerschweinchen nach Sensibilisierung mit DNCB; (deutliche Reaktion)

den Tieren Schwellungen an den Schnauzen und polsterartige Verdickungen an den Pfoten auf. Schon bald nach der Injektion wurden die Tiere unruhig, wischten sich die Schnauzen und hatten anscheinend Juckreiz, den sie durch Reiben und Einwühlen in den Streuboden des Käfigs zu bekämpfen versuchten.

Vorversuche: In 20 Vorversuchen konnten wir dieses Phänomen jeweils auslösen.

Entsprechend unserer Fragestellung suchten wir zunächst festzustellen, ob und inwieweit das Mph imstande ist, den Sensibilisierungsvorgang mit DNCB zu beeinflussen. Es erschien uns wichtig, Mph in

verschiedenen Phasen der DNCB-Sensibilisierung zu geben. Dementsprechend prüften wir zunächst unter Mph-Medikation den Ablauf der ekzematoiden Reaktion, die durch die zweite, schwach konzentrierte DNCB-Pinselung hervorgerufen wurde. Wir wollten sehen, ob die ekzematoide Reaktion, die mit der zweiten, schwach konzentrierten DNCB-Lösung ausgelöst wurde, bei Tieren, die einer Mph-Wirkung ausgesetzt waren, anders verläuft. Wir verfuhren dementsprechend bei einer Reihe von Tieren folgendermaßen:

Abb. 3. Ekzematoide Reaktion auf der Rückenhaut von Meerschweinchen nach Sensibilisierung mit DNCB; (starke Reaktion)

Applikation von 30 bis 40 mg Mph/kg Körpergewicht täglich 1 mal i.m.; falls die Tiere nicht genügend somnolent waren, zweimalige Injektion täglich, 4—6 Tage vor und 4 Tage während der DNCB-Anwendung. (Da das Mph bei den Tieren in unverdünntem Zustand leicht Abscesse hervorrief, wurde es mit physiol. Kochsalzlösung 1:10 verdünnt.)

Bei einer Reihe von Tieren modifizierten wir die Versuchsanordnung so, daß wir sowohl vor der Anwendung des schwachkonzentrierten DNCB als auch bei der Applikation des 5%igen DNCB Megaphen injizierten.

Tabelle 1. *Einfluß des Megaphens auf die an der Haut von Meerschweinchen durch Dinitrochlorbenzol ausgelösten Reaktionen*

Stärke der Hautreaktion	Versuchsreihe I (17 Versuche) Megaphenapplik. kurz vor u. währ. der 2. DNCB-Anwendung	Versuchsreihe Ia (10 Versuche) Megaphenapplik. kurz vor u. währ. der 1.u. 2.DNCB-Anwendung	Versuchsreihe II (19 Versuche) Megaphenapplik. zwischen der 1. u. 2. DNCB-Anwendung	Hautreaktionen in 20 Versuchen nach der 2. DNCB-Anwendung bei Kontrolltieren, die kein Megaphen bekamen
keine Reaktion	1	3	—	—
schwache „	10	4	5	4
deutliche „	3	1	14	2
starke „	3	2	—	14

Die Dosierung blieb bei Anwendung der $^1/_4$%igen DNCB-Lösung die gleiche wie oben angegeben, während wir bei der ersten DNCB-Anwendung (5%) nur 2 Tage vor und 2 Tage während, d. h. nach dem Auftropfen, Mph verabreichten.

In einer neuen Versuchsreihe applizierten wir Mph nach Abklingen der ersten Reaktion auf 5%iges DNCB und rieben dann das $^1/_4$%ige DNCB 5 Tage nach der letzten Mph-Injektion ein. Diese Reihe sollte uns Aufschluß geben, ob das Mph etwa in den latenten Sensibilisierungsvorgang eingreift. Das Mph wurde während 8 Tagen in der oben genannten Dosierung angewandt.

Die Ergebnisse dieser 3 Untersuchungsserien sind aus Tab. 1 und Abb. 1, 2 und 3 zu ersehen.

Ob das Mph imstande ist, die durch 5%iges DNCB hervorgerufene starke entzündliche Reaktion zu beeinflussen, prüften wir in einer weiteren, kleineren Versuchsreihe. In diesen Versuchen, bei denen wir 3 Tage vor und 3 Tage nach der Anwendung von 5%igem DNCB Mph in gleicher Dosierung, wie oben angegeben, verabreichten, konnten wir keine wesentlichen Unterschiede im Grad der entzündlichen Reaktion, beim Vergleich mit den Versuchen ohne Mph, erkennen.

Der zweiten Fragestellung entsprechend, lösten wir das SS-Phänomen unter den gleichen Bedingungen, wie oben beschrieben, bei Kaninchen aus, die Mph bekamen. Die Tiere erhielten 3 Tage vor Beginn des Versuches und am Tage des Einbringens der Meningokokkenaufschwemmung in die Bauchhaut Mph 30—35 mg/kg Körpergewicht pro Dosis. Bei ungenügender Somnolenz mehrfache Wiederholung dieser Dosis.

Tabelle 2. Schwartzman-Sanarelli-*Phänomen während Megaphenverabreichung*

Anzahl der Versuche	Phänomen ausgeblieben	Phänomen abgeschwächt	Phänomen positiv
11	6	3	2

Aus der dritten Fragestellung ergab sich folgende Versuchsanordnung: Wir suchten das Pfötchen-Phänomen bei Ratten auszulösen, denen Mph verabreicht worden war. Einen Tag vor Versuchsbeginn und dann 3 Std vor der Eiweiß- bzw. Macrodex-Injektion 20—25 mg/kg Körpergewicht/Dosis Mph i.m. Bei ungenügender Somnolenz Wiederholung dieser Dosen am Tag vor Versuchsbeginn. In 12 Versuchen (6 mit Hühnereiweiß und 6 mit Macrodex) blieb das Phänomen stets aus.

Besprechung der Ergebnisse

Vergleichen wir die Ergebnisse der Versuchsreihe I und Ia mit den Kontrollversuchen, so fällt auf, daß bei den Kontrolltieren die ekzematoide Reaktion nach der 2. DNCB-Anwendung sehr viel öfter stark ausgeprägt war, und zwar in etwa $^3/_4$ der Versuche, dagegen bei Tieren, die

Mph bekamen, nur in etwa $^1/_5$ der Versuche. Ferner zeigte es sich, daß bei den Kontrolltieren kein einziges Mal die Reaktion ausblieb, während bei der Versuchsreihe I und Ia in einzelnen Fällen die ekzematoide Reaktion bei Mph-Applikation gänzlich unterdrückt werden konnte. Dementsprechend ist der Prozentsatz der schwachen Reaktionen in den Versuchsreihen I und Ia ebenfalls häufiger, und zwar in etwa $^1/_2$ der beiden Versuchsreihen, gegenüber etwa $^1/_5$ der Kontrollserie. Die Zahl der deutlichen Reaktionen ist bei den Versuchsreihen I und Ia zwar insgesamt größer als bei den Kontrolltieren, doch besagt dies nicht viel, da — wie gesagt — in diesen beiden Versuchsreihen, im Gegensatz zu den Kontrollen, die starken Reaktionen seltener vorkamen. Wir glauben, die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen I und Ia mit dem gleichen Maßstab messen zu können, denn die Ergebnisse beider Versuchsreihen beziehen sich auf die eigentliche, durch wiederholte DNCB-Anwendung ausgelöste ekzematoide Reaktion der Haut. Da wir gesehen haben, daß die starke durch 5%iges DNCB hervorgerufene entzündliche Reaktion durch Mph nicht wesentlich unterdrückt werden konnte, müssen wir annehmen, daß bei der Ia-Versuchsreihe die Änderungen der ekzematoiden Reaktionen — wie bei der Versuchsreihe I — auf die Applikation des Mph kurz vor und während der zweiten DNCB-Anwendung zurückzuführen ist.

Aus diesen beiden Versuchsreihen glauben wir den Schluß ziehen zu können, daß das Mph fähig ist, das Zustandekommen der durch DNCB hervorgerufenen ekzematoiden Reaktion zu hemmen, in einzelnen Fällen sogar ganz zu unterdrücken.

Wenn wir nun die Ergebnisse der Versuchsreihe II betrachten, so zeigt es sich, daß hier keine wesentliche oder nur geringe Unterdrückung der ekzematoiden Reaktionen festzustellen war. Das im Intervall, also nach Abklingen der durch das 5%ige DNCB hervorgerufenen entzündlichen Reaktion applizierte Mph genügte anscheinend nicht, um die in Gang gekommene Sensibilisierung wesentlich zu beeinflussen, so daß die ekzematoide Reaktion — ausgelöst durch das $^1/_4$%ige DNCB — die in diesem Falle bei wachen, nicht der Mph-Wirkung ausgesetzten Tieren ausgelöst wurde, nicht wesentlich unterdrückt war. Allerdings war eine geringe Abschwächung der Reaktion auch hier erkennbar; denn im Vergleich zu den Kontrolltieren kam die ekzematoide Reaktion in keinem Fall zur vollen Entfaltung.

Aus diesen Versuchsreihen möchten wir folgern, daß das Mph — gegeben in der latenten Sensibilisierungsphase — nur in geringer Weise das Zustandekommen der durch das DNCB hervorgerufenen ekzematoiden Reaktion beeinflußt.

Im Gegensatz zu den Kontrollversuchen, bei denen das Schwartzman-Sanarelli-Phänomen jeweils deutlich auslösbar war, wurde bei den Kaninchen, denen Mph unter den Bedingungen der Mph-Applikation

gegeben wurde, wie die Tabelle zeigt, das Phänomen in über der Hälfte der Versuche ausgelöscht. Dreimal trat es deutlich abgeschwächt auf, bei zwei weiteren Tieren war kein erkennbarer Unterschied gegenüber den Kontrolltieren festzustellen. Wir glauben, auf Grund dieser Versuchsreihen annehmen zu können, daß das Mph imstande ist, das SS-Phänomen abzuschwächen bzw. ganz zu unterdrücken.

Die Hyperergieversuche gegenüber Fremdeiweiß und Macrodex fielen unter den Bedingungen der Mph-Applikation eindeutig aus. (Nach den Untersuchungen von Hahn und Wellmann setzt das Macrodex speziell bei der Ratte in erheblichem Maße Histamin frei, wodurch wohl der gleiche Effekt wie beim Fremdeiweiß erzielt werden kann.) Bei allen Tieren konnte, im Gegensatz zu den Kontrollen, kein einziges Mal das Pfötchenphänomen ausgelöst werden. Es folgt daraus, daß das Mph die hyperergischen Reaktionen gegen Fremdeiweiß und Macrodex unterdrückt.

Die Ergebnisse aller unserer Versuche zeigen, daß das Mph allergisch-hyperergische Phänomene zu unterdrücken vermag. Sie bestätigen damit die Versuche von Jentzer und Lecomte, die die Tuberkulinreaktion nach Mendel-Mantoux durch Gaben von Mph abschwächen bzw. unterdrücken konnten. Die genannten Verfasser vermochten auch den anaphylaktischen Schock bei Meerschweinchen sowie die Prausnitz-Küstnersche Reaktion und das Schwartmzan-Sanarelli-Phänomen abzuschwächen bzw. ganz zu verhindern. Das Arthus-Phänomen konnte jedoch nicht beeinflußt werden.

Da sich bei jedem allergischen Phänomen — wie eingangs erwähnt — außerordentlich komplizierte Vorgänge abspielen, die wohl nicht nur humoraler sondern auch nervaler, hormonaler und vasculärer Art sind, ist es schwierig zu entscheiden, auf welchem Wege das Mph die allergischen Reaktionen unterdrückt. Am ehesten wäre an einen nervalen Vorgang zu denken, denn Mph ist ein Präparat, das eine hemmende Wirkung auf das zentrale und das peripher-vegetative Nervensystem hat. Auch ist bekannt, daß beim Ausschalten des Nervensystems allergische Phänomene einzudämmen sind.

So gelingt es nicht, bei einem hochsensibilisierten Tier einen anaphylaktischen Schock auszulösen, wenn man das Tier narkotisiert, also gewissermaßen das Nervensystem ausschaltet. Tusch u. Moser zeigten ferner, daß der anaphylaktische Schock nicht auslösbar ist, wenn man bei einem Tier vor der Sensibilisierung das Halsmark durchtrennt. In gleicher Weise zu deuten sind die eingangs erwähnten Versuche von Storck u. Koella, die den Ausgangspunkt unserer Versuche mit DNCB bildeten. Man könnte also annehmen, daß beim Zustandekommen der allergischen Reaktion ein in seiner Funktion nicht beeinträchtigtes Nervensystem eine conditio sine qua non ist und daß beim Eindämmen oder Ausschalten desselben die Reaktion schwächer auftritt bzw. gar nicht zustande kommt. Doch dürfte sich der eigentliche Vorgang komplizierter abspielen.

Laborit, durch dessen grundlegende Arbeiten die Phenothiazine in die Therapie eingeführt wurden, spricht von einer „chemischen

Hypophysektomie", die durch die Phenothiazine bedingt wird. Man könnte also bei der Deutung des hemmenden Einflusses des Mph auf das Zustandekommen der allergischen Phänomene auch dem Hypophysen-Nebennierenrindensystem Aufmerksamkeit schenken. Daß hormonale Vorgänge beim Zustandekommen der allergischen Reaktion mit eine Rolle spielen, wird heute allgemein anerkannt. Das geht schon aus den Therapieeffekten mit ACTH und Cortison bei Allergosen hervor und wird auch, wie eingangs erwähnt, von Letterer in seiner Arbeit über das Wesen der Allergie hervorgehoben. Es erscheint uns daher keineswegs ausgeschlossen, daß die Unterdrückung des allergischen Geschehens durch Mph zumindest zum Teil auf einer solchen „chemischen Hypophysektomie" beruht. Wir berichteten über einen ACTH-Effekt des Olobintins, das sich uns öfters, besonders bei schweren generalisierten Ekzemen, therapeutisch bewährte. Es war bei unseren Mph-Versuchen naheliegend, nachzuprüfen, ob die ACTH-mimetische Wirkung des Olobintins durch Mph unterdrückbar ist. Diese Fragestellung war auch deshalb von Interesse, weil sich dabei ein Weg bot, die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen Tonuttis zu stützen. Tonutti glaubte aus seinen Untersuchungen den Schluß ziehen zu können, daß die Hypophyse den Impuls zur verstärkten Aktivität und somit zur Ausschüttung von ACTH aus dem Nervensystem, speziell aus dem Diencephalon, empfängt. Es war zu erwarten, daß bei Anwendung eines auf das gesamte Nervensystem hemmend einwirkenden Mittels, wie es das Mph darstellt, dieser Impuls unterbleiben würde. So führten wir denn weitere Versuche aus:

Die *Versuchstechnik* dieser Experimente ist bei Bohnstedt-Lanz nachzulesen. Unter Zugrundelegung der neuen Fragestellung gaben wir jetzt: 3 Tage vor der Olobintin-Injektion und bis zum Höhepunkt der Olobintin-Wirkung, am 3. Tage p.inj., je 20—25 mg/kg Körpergewicht/Dosis Mph i.m. (6 Ratten, 6 Meerschweinchen).

Es zeigte sich in 12 Versuchen, daß in keinem Fall, im Gegensatz zu den Versuchen ohne Mph, eine progressive Transformation der Nebennierenrinde zu erkennen war. Wir glauben deswegen aus unserer Versuchsreihe den Schluß ziehen zu können, daß das Mph in der Tat die ACTH-mimetische Wirkung des Olobintins aufhebt. Wir müssen annehmen, daß die Hypophyse infolge einer Blockade des Nervensystems durch das Mph nicht den verstärkten Impuls zur Aktivität bekommt, so daß die vermehrte ACTH-Ausschüttung unterbleibt, womit die obenerwähnten Anschauungen Tonuttis gestützt wären.

Zusammenfassung

Es wurde geprüft, inwiefern das Megaphen an der Haut von Meerschweinchen eine durch DNCB-Sensibilisierung hervorgerufene ekzematoide Reaktion auszulöschen vermag. In weiteren Versuchen wurde der

Einfluß des Megaphen auf das Schwartzman-Sanarelli-Phänomen und durch Fremdeiweiß und Macrodex hervorgerufene hyperergische Reaktionen studiert. Es zeigte sich, daß das Megaphen die erwähnten Phänomene zu hemmen, teilweise ganz auszulöschen vermag.

Es wurde in einer weiteren Versuchsreihe geprüft, inwieweit das Megaphen bei Mitteln, die einen ACTH-mimetischen Effekt auf die Hypophyse ausüben, blockierend wirkt. Es zeigte sich, daß das Megaphen einen solchen hemmenden Einfluß hat.

Literatur

Bohnstedt, R. M., u. J. M. Eichert: Z. Hautkrkh. **9**, 317 (1950). — Bohnstedt, R. M., u. W. Lanz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 262 (1955). — Jentzer, A.: Ann. d'Endocrin. **13**, 705 (1952); Bull. schweiz. Akad. Med. Wiss. **10**, 12 (1954). — Jentzer, A., N. Corboud u. A. Müller: Anaesthesist **3**, 36 (1954). — Hahn, F., u. A. Wellmann: Klin. Wschr. **1952**, 998. — Koch, F., u. J. Hussong: Z. Hautkrkh. **18**, 8, 221 (1955). – Kreibich, C.: Jadassohnsches Handbuch d. Haut- u. Geschl.-Krankh. VI/1. Berlin: Springer 1927. — Laborit, H., et P. Huguenard: Presse med. **1951**, 1329; **1952**, 1455. — Lecomte, J., et C. Borensztajn: C. r. Soc. Biol. (Paris) **147**, 743 (1953). — Letterer, E.: Dtsch. med. Wschr. **1953**, 759. — Reimers, H.: zit. nach F. Koch u. J. Hussong: Z. Hautkrkh. **18**, 8, 221 (1955). — Schmidt, H.: Jahrbuch d. allergischen Krankheiten, Bd. II, 1951. — Schoog, M.: J. Hautkrkh. **15**, 176 (1953). — Schuermann, H.: zit. nach F. Koch u. J. Hussong, Z. Hautkrkh. **18**, 8, 221 (1955). — Selye, H.: Vortrag med. Ges. Gießen 15. 9. 54. — Storck, H.: zit. nach H. Storck u. W. P. Koella, Hautarzt **1952**, 509. — Tonutti, E.: Verh. dtsch. Ges. Chir. 1949. — Tusch, E., u. H. Moser: Z. Immun.forsch. **108**, 89 (1950).

Prof. Dr. R. M. Bohnstedt, Hautklinik d. Justus-Liebig-Hochschule Gießen

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 497—508 (1956)

Aus den pharmakologischen Laboratorien der J. R. Geigy A. G., Basel
(Leitung: Prof. Dr. R. Domenjoz)

Über die wachstums- und entzündungshemmenden Eigenschaften einiger Phenothiazine, Iminodibenzyle und Acridine

Von
G. Wilhelmi

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 22. November 1955)

Wie aus der Literatur der letzten Jahre hervorgeht, zeichnen sich eine Anzahl von Phenothiazinen durch außerordentlich mannigfaltige zentrale und periphere Wirkungen aus. Dementsprechend sind auch die klinischen Indikationen für diese Präparate sehr vielseitig.

Manche Wirkungen und Nebenwirkungen dieser Präparate ließen es als interessant erscheinen, deren Einfluß auf die Zellteilung, das Wachstum überhaupt und damit im Zusammenhang die Wirkung auf entzündliche Prozesse zu untersuchen. Wir beabsichtigten dabei, auch die Beobachtungen über einen antiphlogistischen Effekt der Präparate bei operationsbedingten Ödemen und anderen Entzündungen durch das Tierexperiment zu objektivieren. Zum Vergleich wurden noch einige andere Präparate wie Iminodibenzyle (Domenjoz[12], Schindler u. Häfliger[36], Benstz[4]) mit zum Teil ähnlichen pharmakologischen Eigenschaften, sowie Acridine mitgetestet. Obwohl bereits eine ganze Anzahl von Einzelbeobachtungen über die wachstumshemmenden und antiphlogistischen Eigenschaften der Phenothiazine an tierischen und pflanzlichen Objekten vorliegen, sollte durch neue Experimente der Versuch unternommen werden, den Wirkungsgrad einer größeren Zahl von Präparaten zu Vergleichszwecken quantitativ zu erfassen.

In früheren Untersuchungen wurde bereits ein hemmender Einfluß einer Anzahl von Antihistaminpräparaten auf den Regenerationsprozeß bei verschiedenen Tierarten festgestellt[38]. Die Befunde stehen im Einklang mit einer Reihe von ähnlichen Beobachtungen anderer Autoren.

Da Promethazin nach Untersuchungen von Driessens[13] bei der Fibroblastenkultur und nach eigenen Beobachtungen beim Regenerationsvorgang eine Hemmwirkung entfaltet[38] und da das Präparat nach Halpern u. Mitarb.[17] die cytotoxische Phase bei der Röntgenbestrahlung von Ratten verstärkt, stellten wir uns die Frage, ob nicht nur ähnliche Präparate aus der Phenothiazinreihe, sondern auch Phenothiazine mit Farbstoffcharakter, sowie gewisse Iminodibenzyle wie die untersuchten Antihistamine einen wachstumshemmenden Effekt zustande zu bringen

vermögen. Auf eine entsprechende Wirkung mancher Phenothiazine weisen einige Beobachtungen, wie der wachstumsvermindernde Effekt solcher Präparate auf Ratten hin (Kopera u. Armitage[21]; Meidinger[26]), wobei auch eine Entwicklungshemmung der Testes und Ovarien dieser Tiere, sowie beim Menschen das Auftreten von Potenzstörungen und Amenorrhoe nach Chlorpromazin (Labhardt[23]) festgestellt wurden. Weiterhin ist in diesem Zusammenhang die durch verschiedene Phenothiazine bedingte Hemmung des Heilungsverlaufes von Erfrierungsdefekten am Kaninchenohr (Meidinger u. Kolsky[27]) und die von Peters[31]) beschriebene Verminderung der Mitosehäufigkeit sowie die Verlangsamung des Teilungsablaufes bei den Wurzelspitzenzellen von Vicia faba zu erwähnen. Entsprechende Befunde mit Chlorpromazin und anderen Phenothiazinen wurden von Deysson u. Mitarb[11] mitgeteilt, wobei festgestellt wurde, daß der Eintritt der Zellen in die Teilung gehemmt, die einmal im Gang befindlichen Mitosen jedoch nicht beeinflußt werden. (Pisum sativum und Allium cepa). Nach Decourt u. Mitarb.[8, 10] wird auch die Aktivität von Infusorien durch Chlorpromazin herabgesetzt und die Entwicklung des Seeigeleis gehemmt.

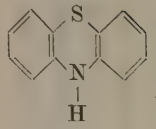
Auf Grund dieser Beobachtungen erschien es interessant, den Einfluß der erwähnten Präparate mit oder ohne histaminantagonistischen oder stoffwechselsenkenden Eigenschaften auf Wachstumsprozesse wie die Regeneration bei verschiedenen Wassertieren, die Eientwicklung und das Wurzelkeimwachstum von Leguminosen genauer zu studieren. Als zoologische Objekte, die über eine besonders ausgeprägte Regenerationsenergie verfügen, wurden Molche und Planarien verwendet, zu Zellteilungs- und Embryonisierungsstudien die Eier von verschiedenen Seeigel- und Froscharten.

Bei nahezu ausgewachsenen Exemplaren von *Amblystoma mexicanum* wurden je 3 Löcher mit einem Durchmesser von 4,4 mm in den Schwanzsaum eingestanzt und deren Verheilungsgrad an verschiedenen Tagen, hauptsächlich am 12. Tag nach der Operation, meist nach Augenmaß bestimmt (Wassertemperatur um 19° C). Es besteht auch die Möglichkeit, das Regenerat photographisch, also in 2 Dimensionen, oder durch eine zweite Excision gewichtsmäßig zu erfassen. Die Präparate wurden vom 3.—12. Tag 2mal täglich intraperitoneal injiziert[41].

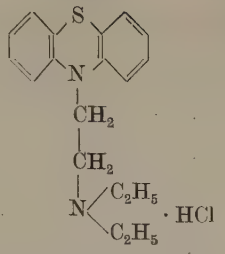
Bei *Planaria gonocephala* wurde zur Beurteilung der regenerationshemmenden Wirkung die Zahl der Tiere bestimmt, die am 7. Tag nach der Decapitation den Kopf noch nicht bis zum Stadium des Erscheinens der Augen wiedergebildet hatten. Nach dem Köpfen wurden die Würmer in Gruppen von je 10—20 Exemplaren verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Präparate vom unwirksamen bis zum toxischen Wirkungsbereich während 48 Std (Temperatur 17—20° C ausgesetzt. An verschiedenen Tagen wurde die Anzahl der noch augenlosen Planarien bestimmt, wobei die Beurteilung der Regenerationsleistung in diesen Experimenten am 7. Tag nach der Kopfamputation vorgenommen wurde. (Genaue Beschreibung des Tests: Wilhelmi u. Steinmann[41].) Es besteht auch die Möglichkeit, die Turbellarien zu photographieren und das sich gut abhebende, zunächst nahezu pigmentfreie Regenerat zu planimetrieren.

Zu orientierenden Versuchen wurden die Eier verschiedener Seeigelarten, insbesondere von *Arbacia lixula* und *Paracentrotus lividus* in der üblichen Weise gewonnen. Einige Minuten nach der Befruchtung in vitro wurden sie verschiedenen Konzentrationen von Präparaten ausgesetzt. Der Entwicklungsgrad der Eier wurde zu verschiedenen Zeiten im Mikroskop bestimmt, wobei das Hauptgewicht auf die Feststellung gelegt wurde, ob nach 2 Std das 2—4-Zellstadium erreicht wurde oder nicht.

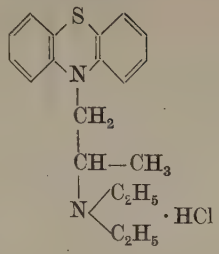
Phenothiazin



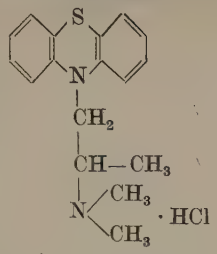
Diethazin



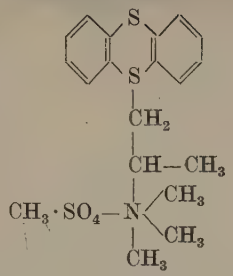
Ethopropazin



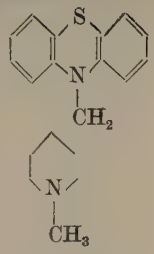
Promethazin



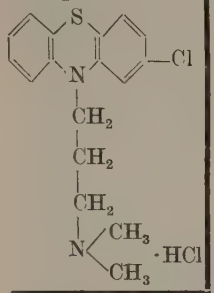
Thiazinamium



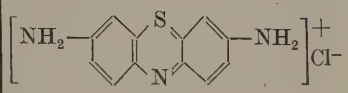
MPMP*



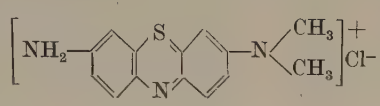
Chlorpromazin



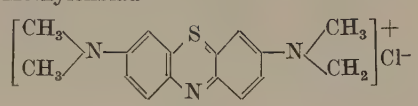
Thionin



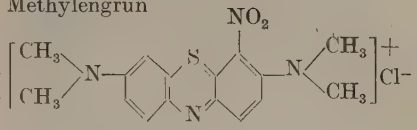
Azur I



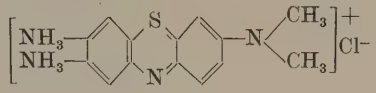
Methylenblau



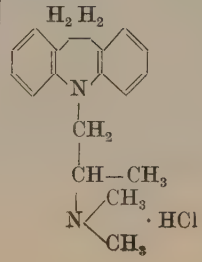
Methylengrün



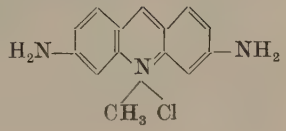
Toluidinblau



G 22150



Trypaflavin



Ebenfalls orientierende Versuche wurden mit befruchteten Eiern von *Rana temporaria*, zum Teil auch von *Xenopus laevis* angestellt, wobei für gewöhnlich nicht der Furchungsprozeß, sondern der Beginn der Embryonisierung bzw. die Entstehung der Larven beobachtet und als Kriterium für die Wachstumsleistung verwendet wurde.

Schließlich wurden noch Untersuchungen über den Einfluß einiger Präparate auf das Wachstum der Wurzelkeime der Leguminosen *Pisum sativum* und *Lens* durchgeführt. Die Erbsen und Linsen wurden täglich 6 Std lang während 4 Tagen verschiedenen Lösungen ausgesetzt und während der übrigen Zeit in der feuchten Kammer auf Zellstoff, der mit den gleichen Lösungen getränkt war, gelagert. Am 5. Tag wurden die Wurzelkeime abgetrennt und im Kollektiv zu 10 Stück gewogen. Der Versuch wurde 1—5mal wiederholt, so daß das Gewicht von mindestens 20, meist aber von 30 oder mehr Wurzeln pro Konzentration ermittelt wurde. Das Gewicht der behandelten Keime wurde jeweils zu demjenigen von (je 30) nur mit Leitungswasser benetzten Wurzelkeimen in Beziehung gesetzt.

Die in Tab. 1 aufgeführten Phenothiazinpräparate, wovon 6 bei der Hibernation artificielle verwendet werden, weiterhin 5 basische Farbstoffe dieser Präparatgruppe, von denen zum Teil schon wachstumshemmende Eigenschaften bekannt sind (Methylenblau: [1, 3, 5, 19, 20, 29, 30, 32, 34, 35, 37] u. a., Toluidinblau: [3, 25, 27], Thionin: [20]) wurden im Regenerationstest an Planarien, zum Teil auch am Axolotl, bzw. in den genannten Eientwicklungs- und Wurzelkeimtests untersucht. Ferner wurden zu Vergleichszwecken G 22150, ein Präparat aus der Iminodibenzylreihe und das als spezifisches Mitosegift bekannte Acridinpräparat Trypaflavin, zum Teil auch weitere Vertreter dieser beiden Präparatgruppen, in die Untersuchungen einbezogen.

Die durch Anwendung der beschriebenen Methoden gewonnenen Resultate zeigen, daß allen genannten Phenothiazin- und Iminodibenzylpräparaten eine gewisse wachstumshemmende Wirkung zukommt. Die verschiedenen Versuchsanordnungen ergaben nicht ganz einheitliche Resultate, so daß eine ungleiche Empfindlichkeit der einzelnen Tierarten gegenüber den verwendeten Pharmaka angenommen werden muß. Immerhin erweisen sich einige Präparate, wie Chlorpromazin, Diethazin, MPMP, zum Teil auch Methylengrün und Azur I als stark regenerationshemmend, wobei die Reihenfolge je nach der Beurteilungsweise, ob eine Aktivität in den kleinsten Dosen oder ob die Wirkungsbreite besonders in Betracht gezogen wird, etwas wechselt. Es kann jedoch festgestellt werden, daß Chlorpromazin in beiden Regenerationstests, sowie bei der Prüfung des Einflusses auf das Wachstum der Leguminose-Wurzelkeime und die Entwicklung der Ranideneier schon in besonders kleinen Dosen bzw. sehr niedrigen Konzentrationen deutlich wirksam ist (Tab. 2 u. 3).

1. Der regenerationsverzögernde Effekt von Chlorpromazin im Vergleich zu demjenigen von Promethazin am *Axolotl* geht aus der Abb. 1 hervor, wobei der durchschnittliche Heilungsgrad einer Gruppe von 5 Molchen mit je 3 (am narkotisierten Tier) eingestanzten

Schwanzdefekten vom 10.—15. Tag nach der Operation im Vergleich zu demjenigen unbehandelter Kontrolltiere dargestellt ist. Auf die Feststellung der Heilungsstadien vor dem 10. Tag wurde verzichtet, da der Regenerationsprozeß insbesondere während der ersten Woche nur sehr langsam anläuft und da makroskopisch von einem Regenerat noch kaum etwas sichtbar ist. Hierbei bedeutet z. B. 50% oder 80%, daß die einzelnen Defekte im Durchschnitt zur Hälfte bzw. zu 80% geschlossen sind. Tab. 2 zeigt die mittlere Regenerationsleistung der mit verschiedenen Präpa-

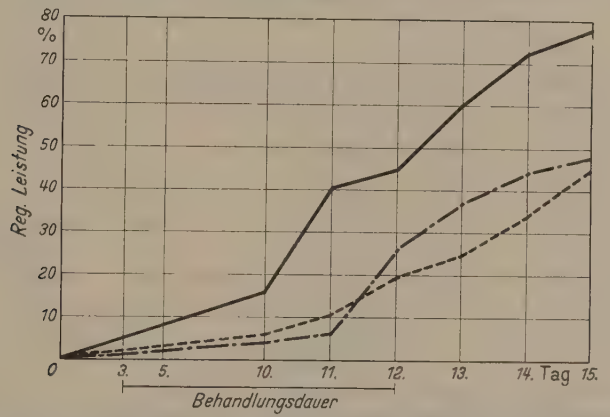


Abb. 1. Regenerationsleistung bei Amblystoma mexicanum, erkennbar an der durchschnittlichen Verkleinerung der operativ gesetzten Defektflächen am Schwanz von je 5 Molchen pro Versuchsgruppe. Darstellung der Flächenänderung in Prozenten, bezogen auf das Ausgangsareal, während 15 Tagen nach der Operation ——— unbehandelte Kontrollgruppe. - - - - - Gruppe mit täglich 2 × 10 mg/kg Promethazin i.p. —·— Gruppe mit täglich 2 × 2,5 mg/kg Chlorpromazin i.p.

raten behandelten Tiergruppen, wobei der Status am 12. Tag nach der Operation dargestellt ist. Die Leistung der Kontrollgruppe wird hier mit 100% gewertet, diejenige der behandelten Tiere ist in wechselndem Ausmaß reduziert, wobei sich neben Trypaflavin insbesondere Chlorpromazin, MPMP und Promethazin als deutlich wirksam erwiesen. Thiazinamium zeigt nur in toxischen Dosen einen stark wachstumshemmenden Effekt, so daß hier nicht von einer spezifischen Wirkung gesprochen werden kann.

2. Die Versuche an *Planaria gonocephala* (Tab. 3) zeigen, daß nicht nur den für die Hibernation artificielle und als Psychoplegica verwendeten Phenothiazinen, sondern auch den genannten Farbstoffen dieser Präparatgruppe ein wachstumshemmender Effekt zukommt. Wenn man hierbei noch den Wirkungsindex = Conc. eff. 50 : Conc. let. 50 (Quotient aus der schwächsten noch sicher, d. h. bei 50% der Würmer wirksamen Konzentration und der für die Hälfte der Planarien letalen Verdünnung) in Betracht zieht, so zeigen nur Trypaflavin — wie übrigens auch einige andere Acridine und in weiterem Abstand noch Azur I,

Tabelle 2. *Regenerationshemmende Wirkung bei Amblystoma mexicanum*

Präparat	Status am 12. Tag		Letalität (Symptome)	Histaminquaddel Schutzwirkung 50%[2]	Antiphlogistische Wirkung Formalinödem, Ratte	
	Dosis pro die	Regener.-leistung			Dosis	Hemmung[3]
	mg/kg i.p.	in %		ca. mg/kg	mg/kg	%
Kontrollen	—	100,0	—			
Chlorpromazin	2 × 2,5	60,2	1/5 Ex. 10. Tag (z. T. Seitenlage)	4,2	30 i.p.	31,8
Thiazinamium	2 × 2,5	84,5	—	9	20 i.p.	38,5
Thiazinamium	2 × 5	18,4	3/5 Ex. 10.—13. Tag (Ödem)		30 i.p.	tox.
MPMP[1]	2 × 5	75,5	—	5	30 i.p.	22,4
MPMP	2 × 10	39,8	2/5 Ex. 12.—13. Tag			
Promethazin	2 × 10	44,4	—	0,02	30 i.p.	36,6
Ethopropazin	2 × 10	63,0	—	50[4]	60 p. os	22,8
Diethazin	2 × 10	55,6	—	> 50	30 i.p.	34,0
Azur I	2 × 10	83,9	—	20	30 i.p.	30,2
G 22150	2 × 10	59,3	—	11,6	30 i.p.	38,9
Trypaflavin	1 × 4	33,7	3/4 Ex. nach 1—4 Wochen	7,5	10 i.p.	16,1

[1] MPMP = N-Methyl-Piperidyl-(3)-Methyl-Phenothiazin.
[2] Dosen der subcutan verabreichten Präparate, durch die die Histaminquaddel bei 50% der Meerschweinchen unterdrückt wird.
[3] Gegenüber der formalinbedingten Pfotenschwellung unbehandelter Kontrolltiere.
[4] per os.

Tabelle 3. *Regenerationshemmende Wirkung bei Planaria gonocephala*

Präparate	Status 7 Tage nach der Decapitation		$\frac{Conc.\ eff.\ 50}{Conc.\ let.\ 50}$
	Conc. eff. 50	Conc. let. 50	
Chlorpromazin . . .	1:3500000	1:960000	3,6
Diethazin	1:1530000	1:705000	2,2
MPMP[1]	1:1530000	1:470000	3,3
Methylengrün	1: 920000	1:450000	2,0
Ethopropazin	> 1: 750000	1:475000	< 1,6
Toluidinblau.	1: 400000	1:150000	2,7
Promethazin.	1: 390000	1:193000	2,0
Azur I	1: 240000	1: 60000	4,0
Thionin	1: 25000	1: 20000	1,3
Methylenblau	1: 25000	1: 15000	1,7
Thiazinamium	1: 4200	1: 2730	1,5
G 22150	1: 750000	1:374000	2,0
Trypaflavin	1: 405000	1: 54000	7,5

[1] N-Methyl-Piperidyl-(3)-Methyl-Phenothiazin.
> = stärkere Konzentration als
< = kleinerer Wert als

Chlorpromazin und MPMP eine größere Wirkungsbreite. Auch G 22150 und andere Präparate aus der Iminodibenzylgruppe ergaben einen relativ starken wachstumshemmenden Effekt, ohne jedoch eine Wirkungsbreite von Bedeutung aufzuweisen.

3. Untersuchungen an natürlich befruchteten Eiern von *Rana temporaria* (Tab. 4) zeigten eine starke entwicklungshemmende Wirkung

Tabelle 4. *Wirkung auf die Eientwicklung von Rana temporaria* (Orientierung). (Resultate bei 3tägiger Einwirkungsdauer)

Präparate	*Wirksame Konzentrationen*	
	Partielle Hemmung	Volle Hemmung
Chlorpromazin	> 1:100000	1:30000
MPMP[1]	> 1:100000	1:30000
Promethazin	1: 30000	1:10000
Diethazin	1: 30000	1:10000
Ethopropazin	1: 30000	1:10000
Methylenblau	1: 10000	1: 3000
Methylengrün	1: 10000	1: 3000[2]
Thionin	1: 10000	1: 1000
Toluidinblau	> 1: 10000	1: 3000
Azur I	> 1: 10000	1: 3000[2]
Thiazinamium	1: 3000	1: 1000
G 22150	1:100000	1:30000
Typaflavin	> 1: 30000	1:10000[2]

[1] MPMP = N-Methyl-Piperidyl-(3)-Methyl-Phenothiazin.
[2] Effekt nach Auswaschen partiell reversibel.
> = stärkere Konzentration als

von Chlorpromazin, MPMP und G 22150, die sogar diejenige von Trypaflavin und weiteren Acridinen übertrafen. Auch die übrigen Präparate, mit Einschluß der erwähnten Phenothiazin-Farbstoffe, sowie ein weiteres Iminodibenzyl zeigten noch eine mäßig starke Wirkung.

Die Beurteilung der Befunde wurde vor allem von der Frage abhängig gemacht, ob eine Präparatkonzentration die Embryonisierung völlig hemmt oder ob diese noch in Gang kommt und abgestoppt wird, bevor das freie Larvenstadium erreicht wird bzw. ob deformierte Larven entstehen (partielle Hemmung). Bei den gewählten Versuchsbedingungen war bei den Kontrollen der Beginn der Embryonisierung am Anfang des 3. Tages deutlich sichtbar, während knapp 24 Std später die freien Larven ausgebildet waren. Im Laufe des 3. Tages wurde der Laich ausgewaschen, so daß auch die Frage der Reversibilität abgeklärt werden konnte.

Die am 3. Tage beobachteten kompletten Hemmwirkungen waren nur beim Methylgrün, Azur I und beim Trypaflavin partiell reversibel. Es wurde nicht festgestellt, ob es bei den übrigen Präparaten Zwischenkonzentrationen gibt, bei denen die erzielte Hemmwirkung noch rückgängig gemacht werden könnte. Die Verdünnungsreihen wurden so angesetzt, daß jede folgende Konzentration 3mal schwächer war als die

vorige. Ähnliche Resultate wurden auch bei Versuchen mit Eiern von *Xenopus laevis* erzielt.

4. Orientierende Versuche an befruchteten Eiern von *Paracentrotus lividus* und *Arbacia lixula* (Tab. 5) ergaben, daß bei diesen Objekten die zellteilungshemmende Wirkung des Trypaflavins von den übrigen angewandten Präparaten nicht ganz erreicht wird. In diesen Versuchen erwies sich noch Promethazin als relativ stark wirksam.

Tabelle 5. *Wirkung auf befruchtete Echinideneier (Orientierung)* (Jeweils Mittelwerte aus mehreren Parallelversuchen mit Paracentrotus lividus und Arbacia lixula)

Präparate	Schwächste teilungshemmende Konzentrationen	
	voll wirksam	partiell wirksam
Chlorpromazin	1:16800	1: 25000
Diethazin[1]	1:25000	1: 50000
Promethazin	1:48800	1:115000
Chloropyramin	1:16700	1: 33300
G 22150	1:29200	1: 50000
Trypaflavin	1:75000	1:150000

[1] Diethazin wurde nur an Paracentrotus-Eiern getestet.

Es wurde hier nur das nach 2-stündiger Einwirkung der Substanzen erzielte Resultat verwertet, wobei festgestellt wurde, ob die Zellteilung bis zu diesem Zeitpunkt in Gang gekommen war oder nicht. Bei Wassertemperaturen von etwa 21° C war dann meist das 2—4-Zellstadium, vereinzelt auch schon das 8-Zellstadium erreicht, wenn die Entwicklung nicht gehemmt war. Eine vollständige Wirkung wurde angenommen, wenn eine bestimmte Konzentration jegliche Zellteilung unterdrückte, ein partieller Effekt dann, wenn einzelne Eier noch das 2—4-Zellstadium erreichten.

Bei den verwendeten Seeigelarten ergaben sich keine grundsätzlichen Unterschiede in der Wirkung der untersuchten Phenothiazine. Die in Tab. 5 angegebenen Grenzkonzentrationen stellen Mittelwerte aus mehreren Einzelversuchen dar. Die Frage, wie die Substanzen die späteren Stadien (Morula-, Blastula- oder Pluteus-Stadium) beeinflussen, ist größtenteils noch offen. Weiterhin ist noch abzuklären, ob und wie weit die erzielten Hemmwirkungen reversibel sind. Die Konzentrationsabstände wurden so gewählt, daß jede folgende Lösung aus der vorhergehenden durch Verdünnung 1:1 hergestellt wurde. Teilweise wurden noch Zwischenkonzentrationen verwendet.

5. Bei den Versuchen über die Wachstumsbeeinflussung von Leguminose-Wurzelkeimen (*Pisum sativum* und *Lens*) erwiesen sich — wie aus Tab. 6 hervorgeht — von den Phenothiazinen insbesondere MPMP, Chlorpromazin, Diethazin und außerdem noch G 22150 als besonders stark wachstumshemmend. Die einzelnen Phenothiazine wurden in

verschiedenen Konzentrationen von 1:3000 bis zum unwirksamen Verdünnungsbereich angewendet, wovon in Tab. 6 nur die Konzentrationen 1:10000 und 1:30000 zur Darstellung gebracht wurden. Die Versuche zeigen, daß sich der hemmende Einfluß der Phenothiazine auf das Wachstum auch an pflanzlichen Objekten demonstrieren läßt und daß sich hier im großen und ganzen die gleichen Präparate wie bei den Versuchen mit den verschiedenen erwähnten tierischen Objekten als besonders stark wirksam erweisen.

Tabelle 6. *Wachstumshemmende Wirkung an Leguminosewurzeln*
(Gewichtsbestimmung von je 30—60 Wurzelkeimen pro Konzentration)

Präparate	Status nach 4-tägiger Behandlung Gewichtshemmung gegenüber unbehandelter Kontrolle %			
	Pisum sativum		*Lens*	
	1:10'000	1:30'000	1:10'000	1:30'000
G 22150	72,3	55,7	52,8	49,6
MPMP	49,4	36,6	47,2	25,4
Chlorpromazin	45,4	48,3	48,9	34,8
Diethazin	56,3	28,2	67,7	17,1
Promethazin	54,1	19,6	59,3	37,1
Azur I	39,4	27,5	44,1	28,6
Methylengrün	37,8	23,9	22,7	24,9
Trypaflavin	29,6	24,0	32,8	26,9
Toluidinblau	41,6	15,6	22,3	9,0
Thionin	12,8	16,6	11,0	20,2
Methylenblau	29,6	20,8	22,0	8,8
Ethopropazin	20,8	2,9	17,8	6,2
Thiazinamium	21,8	1,6	6,4	10,9

6. Schließlich ist noch versucht worden, abzuklären, ob der wachstumshemmende Effekt der betreffenden Präparate mit anderen praktisch wichtigen Wirkungen wie dem Histamin-Antagonismus und der Entzündungshemmung in Verbindung gebracht werden kann.

Die erwähnten Phenothiazine verfügen bekanntlich zum Teil über sehr intensive, zum Teil auch über geringe oder praktisch keine histaminantagonistische Eigenschaften. Wir prüften unter anderem ihre Wirksamkeit gegenüber der *Histaminquaddel* des Meerschweinchens (Versuchstechnik: siehe [39]) und fanden, wie aus Tab. 2 hervorgeht, keine Abhängigkeit der Intensität des wachstumshemmenden Effekts von derjenigen der Antihistaminwirkung.

In einer ganzen Anzahl von Publikationen wird darauf hingewiesen, daß den für die Hibernation artificielle verwendeten Phenothiazinen ein antiphlogistischer Effekt bei verschiedenen Arten der akuten experimentellen Entzündung zukommt, so beim Ovalbumin-[7, 22, 28, 33] und Dextranödem[6, 7, 22, 28], sowie der Kaolinentzündung[15] der Rattenpfote, bei der Chloroformentzündung[7], dem durch Kältereiz erzeugten Ohrödem[27] und dem Adrenalin-Lungenödem des Kaninchens, ferner bei der

Xylolentzündung an der Rattenhaut[7]. Hierbei ist die sehr umfangreiche Literatur über Promethazin nicht berücksichtigt worden.

7. In eigenen Untersuchungen erwiesen sich die Phenothiazine und Iminodibenzyle bei allgemeiner Applikation auch bei der Hemmung des *Formalinödems* an der Rattenpfote (Technik: siehe [39]), nicht aber bei der nur mit Erythembildung einhergehenden U.V.-*Lichtentzündung* des Meerschweinchens als mehr oder weniger wirksam. Durch Trypaflavin ist keine signifikante Schwellungsverminderung zu erzielen. Andere Acridinverbindungen waren im Formalinödemtest nur schwach wirksam. Wie Tab. 2 zeigt, besteht jedoch keine Parallele zwischen der Intensität des antiödematösen und des wachstumshemmenden Effekts der untersuchten Präparate.

Bei Anwendung einer besonderen Versuchsanordnung mit lokaler Injektion der Präparate (0,05 cm^3 einer 0,5%igen Lösung s. c.) im Gebiet des Formalinödems an der Rattenpfote (Technik: siehe [40]) ergab sich bei prophylaktischer Applikation von Promethazin, G 22150 und Chlorpromazin und anderen ebenfalls eine gewisse antiphlogistische Wirkung.

Wie die Resultate der Versuche an den Echiniden- und Ranideneiern (siehe Tab. 4 u. 5) zeigen, hemmen die Phenothiazine und die untersuchten Iminodibenzylpräparate wie auch Trypaflavin den Vorgang der Zellteilung. Es ist anzunehmen, daß die durch die erwähnten Pharmaka bewirkte Regenerationsverzögerung nicht vorwiegend durch Einschränkung des Prozesses der Zellverlagerung, sondern durch Hemmung der Zellteilung zustande kommt.

Wahrscheinlich steht diese hemmende Beeinflussung der Zellvermehrung mit der von Laborit[24], Decourt u. Mitarb.[8–10] u. a. erwähnten histoplegischen Wirkung der Phenothiazine im Zusammenhang, wobei bekanntlich eine Einschränkung gewisser Stoffwechselvorgänge der Zelle und deren Folgeerscheinungen festgestellt wurden. Auch die fördernde Wirkung mancher Phenothiazine auf die Ausbreitung von Infektionen (Friebel u. Mitarb.[16], Halpern u. Mitarb.[18] u. a.) mag als Zeichen der Herabsetzung mancher Zellfunktionen gelten. Hierbei ist auch an die entsprechenden Beobachtungen bei der Anwendung von den ebenfalls proliferationshemmenden Präparaten Colchicin, Cortison und ACTH zu erinnern.

Da unsere Regenerationsversuche auch an poikilothermen Tieren eine hemmende Beeinflussung durch die Phenothiazine ergaben, muß angenommen werden, daß entgegen der Ansicht mancher Autoren die dämpfende Wirkung der Phenothiazine auf die Zellaktivität, jedenfalls soweit dies die Funktion der Zellvermehrung betrifft, nicht ausschließlich auf dem Wege der Senkung der Körpertemperatur zustande kommt. Trotzdem muß darauf hingewiesen werden, daß auch bei Kaltblütern

wie beim Axolotl oder bei Turbellarien die Regenerationsgeschwindigkeit durch Senkung der Umgebungstemperatur sehr beträchtlich herabgesetzt werden kann[14, 41]. Es ist daher anzunehmen, daß am homoiothermen Tier beide Mechanismen — Direktwirkung der Phenothiazine auf die Zellen und Senkung der Körperwärme mit Verminderung gewisser Stoffwechselvorgänge und damit mancher Zellfunktionen — eine Rolle spielen können.

Die Tatsache, daß die Phenothiazine und verwandte Präparate die Zellteilung und damit die Entwicklung von Echiniden- und Ranideneiern schon in hohen Verdünnungen hemmen und die erwähnten Befunde von Driessens[13] an der Gewebekultur bzw. von Peters[31] und Deysson u. Mitarb.[11] an Pflanzenzellen sprechen ebenfalls für die Auffassung von Decourt u. Mitarb.[8, 10], wonach den Phenothiazinen eine Direktwirkung auf die Zelle zukommt. Diese dürfte auch unabhängig von der Beeinflussung und Regulierung der Körpertemperatur beim Wirkungsmechanismus und damit möglicherweise auch beim Zustandekommen gewisser Nebenwirkungen dieser Präparate eine Rolle spielen.

Der am Formalinödem an der Rattenpfote nachgewiesene antiödematöse Effekt der meisten untersuchten Phenothiazine (und Iminodibenzyle) deutet darauf hin, daß die bei der Hibernation artificielle zu beobachtende Hemmung der postoperativen Schwellung unter den gleichzeitig verwendeten Präparaten gerade den Phenothiazinen zukommen könnte. Die weiteren Versuche mit lokaler Anwendung der verschiedenen Präparate beim Formalinödem zeigen eindeutig, daß beim Zustandekommen der antiphlogistischen Wirkung der untersuchten Phenothiazine und von G 22150 periphere Mechanismen maßgeblich beteiligt sind. Auch diese Wirkung dürfte zweifellos mit dem histoplegischen Effekt, wie er beim Prozeß der Wundheilung, der Regeneration komplexer Gewebe und der Teilung einzelner Zellen in Erscheinung tritt, in Verbindung stehen. Hierbei ist jedoch das gleichzeitige Vorhandensein von zentralen bzw. neuralen Einwirkungen auf das Gewebe keineswegs auszuschließen.

Zusammenfassung

1. Eine Reihe von Phenothiazinen, darunter auch Farbstoffe, sowie Iminodibenzyle und Acridine, zeigten eine deutliche Hemmwirkung auf den Regenerationsprozeß bei Planaria gonocephala und Amblystoma mexicanum, wobei sich besonders Chlorpromazin als sehr aktiv erwies. Die gleichen Präparate verminderten auch das Wachstum von Leguminose-Wurzelkeimen sehr beträchtlich.

2. Die Zellteilung bei Raniden- und Echinideneiern wird durch die gleichen Präparate meist schon in schwachen Konzentrationen gehemmt.

3. Die untersuchten Phenothiazine und Iminodibenzyle zeigen bei allgemeiner und lokaler Anwendung beim Formalinödem der Ratte eine sichere schwellungsvermindernde Wirkung.

Literatur

[1] Ascione, R.: Pontifica Acad. Sci. Acta **9**, 17 (1945). — [2] Bariéty M., D. Kohler et M. Barbe: C. r. Acad. Sci. (Paris) **236**, 2277 (1953). — [3] Battaglia, E.: Caryologia (Pisa) **2**, 223 (1950); Biol. Abstr. **24**, 35027 (1950). — [4] Benstz, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 377 (1955). — [5] Braunstein, A.: Berl. klin. Wschr. **1913**, 1102. — [6] Courvoisier, S., et R. Ducrot: Arch. internat. Pharmacodynamie **102**, 33 (1955). — [7] Courvoisier, S., J. Fournel, R. Ducrot, M. Kolsky et P. Koetschet: Arch. internat. Pharmacodynamic **92**, 305 (1953). — [8] Decourt, P., M. Brunaud et S. Brunaud: C. r. Soc. Biol. (Paris) **147**, 1605 (1953). — [9] Decourt, P., G. Anguéra et R. Grenat: C. r. Acad. Sci. (Paris) **236**, 2268 (1953). — [10] Decourt, P., et G. Anguéra: C. r. Acad. Sci. (Paris) **236**, 1445 (1953). — [11] Deysson, G., P. Decourt et G. Anguéra: Rev. Path. comp. et Hyg. gén. **54**, 868 (1954). — [12] Domenjoz, R.: 1. Internat. Allergiekongreß, Zch. 1951, Kongreßbericht, S. 493. — [13] Driessens, J.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **146**, 1186 (1952). — [14] Dubois, F.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **142**, 533 (1948). — [15] Ducommun, P.: Praxis (Bern) **1952**, 641. — [16] Friebel, H., u. H. Kästner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 210 (1955). — [17] Halpern, B. N., A. Cuendet u. J. P. May: Schweiz. med. Wschr. **1952**, 1020. — [18] Halpern, B. N., J. Dumas et H. Reber: C. r. Soc. Biol. (Paris) **149**, 1563 (1949). [19] Jacobi, A.: J. Amer. Med. Assoc. **48**, 1545 (1906). — [20] Kisimoto, S.: Jap. J. Obstetr. **23**, 68 (1940). — [21] Kopera, J., and A. K. Armitage: Brit. J. Pharmacol. **9**, 392 (1954). — [22] Kramer, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 82 (1955). — [23] Labhardt, F.: Arch. of Neur. **73**, 288 (1954). — [24] Laborit, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 41 (1954). — [25] Lewis, M. R., and W. R. Lewis: Amer. J. Cancer **16**, 333 (1932); C. A. **26**, 25029 (1932). — [26] Meidinger, F.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **148**, 1086 (1954). — [27] Meidinger, F., et M. Kolsky: J. de Physiol. **45**, 182 (1953). — [28] Meier, J.: Med. Mschr. **8**, 397 (1954). — [29] v. Mosetig-Moorhof, R.: Zbl. Ther. **14**, 1 (1896). — [30] Opitz, E.: Münch. med. Wschr. **1926**, 1624. — [31] Peters, K.: Naturwissenschaften **41**, 89 (1954). — [32] Ranzi, S., u. Mitarb.: Rend. ist. lombardo sci. **79**, 161 (1946); C. A. **43**, 6322 (1949). — [33] Riechert, W., u. O. Eschbach: Arzneimittel-Forsch. **5**, 295 (1955). — [34] Roffo, A. B.: Neoplasmes **10**, 257 (1931). — [35] Roosen, R.: Dtsch. med. Wschr. **1914**, 481. — [36] Schindler, W., u. F. Häfliger: Helvet. chim. Acta **37**, 472 (1954). — [37] Shapiro, H.: Physiologic. Zool. **21**, 218 (1948). — [38] Wilhelmi, G.: Giorn. Ital. Chemioter. **1**, 111 (1953); Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 101 (1953). — [39] Wilhelmi, G.: Die Medizinische **1952**, 1591. — [40] Wilhelmi, G., u. R. Pulver: Arzneimittel-Forsch. **5**, 221 (1955). — [41] Wilhelmi, G., u. P Steinmann: Roux' Arch. **144**, 265 (1950).

Dr. G. Wilhelmi, Pharmakol. Laboratorien d. Geigy A.G., Basel/Schweiz

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 509—518 (1956)

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. N. Henning)

Temperatur und Acidität des Magens bei lokaler Mangeldurchblutung*

Von
L. Demling und J. Zach

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. September 1955)

Die vermehrte Zufuhr arteriellen Blutes zum Magen kann nicht zu einer passiven Temperaturerhöhung dieses Organs führen. Das aus der Aorta stammende arterielle Blut ist kühler als das Pfortader- oder Magenvenenblut, wie sich in schon veröffentlichten Untersuchungen mit Kinzlmeier gezeigt hat. In späteren Experimenten ergab sich, daß eine Drosselung der arteriellen Blutzufuhr trotzdem in der Regel mit einem Temperaturrückgang im Magen verbunden ist. Weitere Untersuchungen waren daher nötig.

Zunächst an 25 Kaninchen wurden gleichzeitig Magen-, Leber- und Rectaltemperatur sowie die Acidität an der Magenschleimhaut gemessen. Bei 22 Tieren veränderten wir die arterielle Magendurchblutung während des Versuchs. 3 Tiere dienten als unbeeinflußte Kontrollen.

Methodik

1. In Pernoctonnarkose (0,4—0,5 cm³ 10%iger Pernoctonlösung/kg i.v.) wurden nach schmaler Eröffnung des Abdomens je ein gut isoliertes Kupfer-Konstantan-Thermoelement in Magen (an der Wand fixiert) und Leber eingebracht. Die zweite Lötstelle der Thermoelemente ruhte in einer mit Eiswasser gefüllten Thermosflasche. Zur Reduktion des aus dem großen Temperaturunterschied (0° und etwa 37—38° C) resultierenden Thermostroms war diesem ein zweiter Stromkreis entgegengeschaltet. Den Magen isolierten wir von der Leber zur Vermeidung der Wärmeleitung durch Zellstoff. Die Rectaltemperatur wurde gleichzeitig mit einem Quecksilberthermometer kontrolliert. Die Ablesung der Temperaturschwankungen erfolgte in der Regel $1^1/_2$ bis 2 Std lang mit Hilfe von Spiegelgalvanometern. Zur Messung der Acidität wurde zusammen mit dem Thermoelement eine Antimonelektrode durch eine kleine, später verschlossene Fistelöffnung in den Magen eingeführt und an der Wand fixiert.

Eine um die Art. coeliaca gelegte und nach außen geleitete Fadenschlinge erlaubte die Drosselung der Blutzufuhr während des Versuches nach Verschluß des Abdomens. Eine völlige Drosselung der arteriellen Blutversorgung gelang aber offenbar nicht in jedem Fall; anscheinend erreichten wir gelegentlich nur eine

* Herrn Professor Dr. N. Henning zum 60. Geburtstag gewidmet.

wesentliche Reduktion. Bei 5 Tieren verminderten wir die Durchblutung der Magenschleimhaut durch die lokale Applikation handelsüblicher 1‰iger Privinlösung. Sie bewirkt eine deutliche Anämisierung der Magenmucosa. Die Durchblutung wurde frühestens 15 min nach Verschluß des Abdomens, meistens jedoch später, durch Anziehen der Fadenschlinge unterbrochen bzw. reduziert. Während des Experiments ruhte das Versuchstier, um einen Wärmeverlust möglichst zu vermeiden, auf einem geheizten Operationstisch.

2. Zur Messung der Acidität wurde in einer zweiten Versuchsanordnung der Magen herausgehoben, breit eröffnet und an der Korpusschleimhaut eine Antimonelektrode befestigt. Die Bezugselektrode wurde über eine Kalium-Chloridbrücke mit den Darmschlingen verbunden. Die sichtbar zutage liegende Magenschleimhaut erlaubte die direkte Beobachtung der Durchblutung. Die Art. coeliaca wurde zwischen die Branchen einer scherenförmigen Klemme gebracht, die es ermöglichte, das Gefäß einzuengen und diese Einengung auf einer Skala abzulesen. Anschließend wurde das Abdomen so weit wieder verschlossen, daß nur die vorgelagerten, locker fixierten Teile der Magenwand sichtbar blieben. Eine teilweise Drosselung der Art. coeliaca rief bei vorsichtiger Dosierung eine Hypoxämie hervor, die in einer charakteristischen lividen Farbe der Magenmucosa zum Ausdruck kam und so kontrolliert werden konnte. Bei 10 Tieren wurden der Oesophagus und beide Nn. vagi dicht unter dem Zwerchfell unterbunden und durchtrennt. Temperaturmessungen wurden bei dieser Versuchsanordnung nicht vorgenommen.

Ergebnisse

1. Bei den 3 Kontrolltieren und während der Vorbereitungsperiode bei den übrigen Kaninchen wurden entweder ein langsames gleichmäßiges Absinken der Temperatur oder keine Veränderung registriert. Nach Anziehen der Fadenschlinge oder nach Verabreichung von Privin, d. h. nach Reduktion der Durchblutung sank die Magentemperatur in 17 von 22 Fällen um 0,1—1,2° C ab (Abb. 1). Fünfmal blieb sie unverändert, davon einmal nach Privin (Tab. 1).

Keineswegs kongruent mit der Magentemperatur verhielt sich die Temperatur der Leber. Sie blieb sechzehnmal unbeeinflußt, fiel zweimal ab und stieg viermal an. Die Rectaltemperatur blieb dreizehnmal unbeeinflußt, fiel dreimal ab und stieg fünfmal an; einmal wurde sie nicht mitgemessen. Die Temperaturschwankungen des Enddarms waren in jedem Fall mit 0,1—0,3° C nur leicht. Es ergab sich somit, daß die Magentemperatur unabhängig von den anderen Größen bei Drosselung der arteriellen Blutzufuhr in etwa $^3/_4$ der Fälle absank. Die Lebertemperatur fiel nur zweimal ab (siehe Tab. 1). Dieser Befund ist von Interesse, weil durch die Unterbindung der Art. coeliaca gleichzeitig auch die Art. hepatica mitbetroffen wird. Die Leber scheint aber ihren Blutbedarf, wie das bereits aus Untersuchungen von Schwiegk bekannt ist, bei Drosselung der Art. hepatica durch eine Steigerung des Zeitvolumens in der Vena portae zu decken. Eine Beeinflussung der Magentemperatur durch die Leber bestand im Hinblick auf die Isolierung beider Organe voneinander sicherlich nicht. Die Versuchsergebnisse lassen einen

zwangsläufigen thermischen Zusammenhang zwischen den beiden Organen vermissen.

Die absoluten Organtemperaturen lagen zwischen 36,5 und 39,5° C. Die Rectaltemperatur war bei 25 Versuchen (einschließlich der Leerversuche) zwölfmal, die Lebertemperatur siebenmal und die Magentemperatur sechsmal durchschnittlich am höchsten.

2. Bei den beschriebenen 25 Versuchen, welche die Abhängigkeit der Magentemperatur von der Durchblutung klären sollten, hatten wir auch die Acidität an der Korpusschleimhaut fortlaufend gemessen. Wir hatten erwartet, daß die Acidität nach Abnahme der Sauerstoffzufuhr absinken würde, wie das bereits von Patterson und Stetten beschrieben worden war. Das war aber überraschenderweise nur achtmal der Fall (darunter kein Privinversuch). Zweimal ging dem Abfall der Acidität ein kurzdauernder Anstieg voraus. Viermal blieben die Säureverhältnisse unverändert, zehnmal stiegen sie an. Der Anstieg der Acidität fand vor allem dann statt, wenn das Absinken der Magentemperatur nur leicht war oder nach Reduktion der Blutzufuhr ausblieb (darunter 1 Privinversuch). Hingegen sank die

Tabelle 1. *Das Verhalten von Magen-, Leber- und Rectaltemperatur nach Drosselung der arteriellen Blutzufuhr mit Hilfe einer um die Arteria coeliaca gelegten Fadenschlinge oder nach lokaler Applikation von Privin*

	Magentemperatur	Lebertemperatur	Rectaltemperatur
1.	— 0,2	+ 0,35	+ 0,3
2.	unverändert	unverändert	unverändert
3.	— 0,2	— 0,1	+ 0,2
4.	— 0,1	unverändert	+ 0,1
5.	— 0,8	— 1,1	+ 0,1
6.	— 0,4	unverändert	unverändert
7.	— 0,2	+ 0,1	— 0,2
8.	unverändert	unverändert	+ 0,1
9.	— 0,25	unverändert	∅
10.	— 0,25	unverändert	unverändert
11.	— 0,15	unverändert	unverändert
12.	unverändert	+ 0,2	— 0,2
13.	— 0,5	unverändert	— 0,2
14. P	unverändert	unverändert	unverändert
15. P	— 0,2	unverändert	unverändert
16. P	— 0,15	unverändert	unverändert
17. P	— 0,2	+ 0,2	unverändert
18. P	— 0,15	unverändert	unverändert
19.	unverändert	unverändert	unverändert
20.	— 1,2	unverändert	unverändert
21.	— 0,15	unverändert	unverändert
22.	— 0,4	unverändert	unverändert

Bei den mit P gekennzeichneten Versuchen wurde eine Anämie der Schleimhaut durch Privin hervorgerufen. Unter den Begriff „unverändert" fallen auch die Organtemperaturen, welche bis zu 15 min nach Drosselung der Blutzufuhr in ihrer Richtung (ansteigend oder abfallend) keine Änderungen zeigten. Die Zahlen in Tab. 1 und 2 entsprechen den maximalen Temperaturabweichungen in Celsiusgraden vom bisherigen Kurvenverlauf innerhalb der ersten 10 min nach Unterbindung.

Acidität gewöhnlich dann ab, wenn auch die Temperatur des Magens deutlich zurückging (Tab. 2). Die gelegentliche geringe oder fehlende Abkühlung der Magenschleimhaut nach Anziehen der Fadenschlinge ließ uns daran denken, daß die Drosselung der arteriellen Blutzufuhr zum Magen in einer Reihe von Versuchen nicht komplett gewesen war. Gerade in diesen Fällen fanden wir den Anstieg der Acidität. Es lag die Vermutung nahe, daß im Gegensatz zur Anoxämie bei der Mangeldurchblutung die Acidität ansteigt. Aus diesem Grunde wurde eine neue Versuchsreihe mit 26 Kaninchen bei veränderter Versuchsanordnung angesetzt (s. Methodik 2).

Eine totale Drosselung der Blutzufuhr ruft in der Regel ein augenblickliches Absinken der Säurewerte hervor. Die anschließende völlige Wiedereröffnung der Klemme läßt die Acidität in die Höhe schnellen und zwar auf etwa

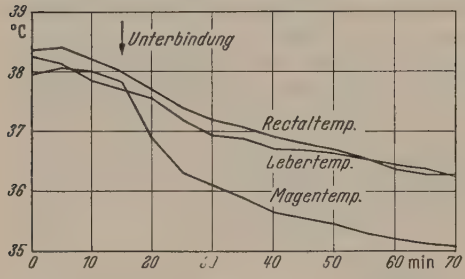


Abb. 1

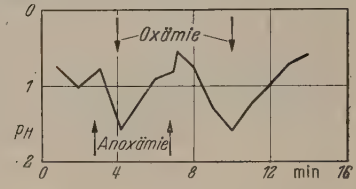


Abb. 2

Abb. 1. Plötzlich verstärkter Abfall der Magentemperatur nach Unterbindung der Arteria coeliaca. Leber- und Rectaltemperatur sinken weiterhin unverändert gleichmäßig ab. Die relative Abkühlung des Magens nimmt im Laufe des Versuchs immer mehr zu. Unmittelbar nach Abbindung der Arteria coeliaca stieg das p_H an der Magenschleimhaut von 1,3 auf 1,9 (p_H-Kurve nicht mitgezeichnet)

Abb. 2. Wirkung von Anoxämie und Oxämie auf die Magenacidität des Kaninchens

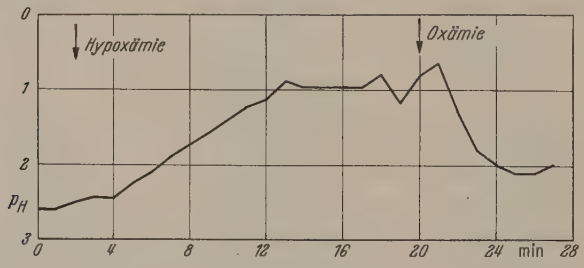


Abb. 3. Der durch Mangeldurchblutung bedingte Säureanstieg geht nach Eröffnung der Klemme weitgehend zurück

das gleiche Niveau wie vor der Anoxämie, falls diese nicht zu lange gedauert hat (Abb. 2). Dem Absinken bei Anoxämie kann ein ganz flüchtiger Säureanstieg vorausgehen, während der Aciditätsanstieg nach Eröffnung der Klemme in manchen Fällen durch einen kurzdauernden Abfall gleich nach Beginn des Anstiegs unterbrochen wird. Die Latenzzeit bis zum Beginn derartiger Aciditätsreaktionen beträgt manchmal weniger als 30 sec. Macht man den Magen nach vorheriger normaler Durchblutung hypoxämisch, d. h. drosselt man die Art. coeliaca

vorsichtig so weit, bis die Mucosa die charakteristische livide Verfärbung zeigt, dann entsteht in den meisten Fällen ein vorübergehender, häufig aber auch ein langanhaltender Säureanstieg, der oft mehrere p_H-Einheiten, auch bei relativ hohem Ausgangswert, beträgt (Abb. 3).

Tabelle 2. *Beziehung zwischen Magentemperatur und Magenacidität nach (wahrscheinlich nicht immer kompletter) Drosselung der arteriellen Blutzufuhr*

	Acidität	Magentemperatur
1.	Anstieg (leicht)	— 0,2
2.	unverändert	unverändert
3.	unverändert	— 0,2
4.	Anstieg	— 0,1
5.	Abfall	— 0,8
6.	Abfall	— 0,4
7.	Abfall	— 0,2
8.	unverändert	unverändert
9.	Abfall	— 0,25
10.	Anstieg/Abfall	— 0,25
11.	Anstieg (stark)	— 0,15
12.	Anstieg	unverändert
13.	Anstieg/Abfall	— 0,5
14. P	Anstieg (leicht)	unverändert
15. P	Anstieg	— 0,2
16. P	unverändert	— 0,15
17. P	Anstieg (leicht)	— 0,2
18. P	Anstieg (leicht)	— 0,15
19.	Anstieg (stark)	unverändert
20.	Abfall	— 1,2
21.	Anstieg (stark)	— 0,15
22.	Abfall (leicht)	— 0,4

Bei den mit P gekennzeichneten Versuchen wurde die Schleimhaut durch Privin anämisiert. Bei den Tieren 10 und 13 ging dem Aciditätsabfall ein flüchtiger (hypoxämischer) Anstieg voraus.

Dieses Verhalten konnte ebenso wie die Anoxämiereaktion auch nach Vagusdurchtrennung festgestellt werden, wenngleich wir hier gelegentlich den Eindruck einer verzögerten Reaktionsweise hatten. Bei insgesamt 26 Versuchstieren konnten wir den Säureanstieg nach Mangeldurchblutung in 15 Fällen (davon 7 vagotomierten) in erheblichem Ausmaß nachweisen. Siebenmal (2 vagotomiert) war der Säureanstieg schwächer, aber deutlich ausgeprägt. 3 Versuchstiere reagierten nicht und eines (vagotomiert) zeigte einen Säureabfall nach Mangeldurchblutung. In 2 Versuchen (die wir zu den positiven gezählt haben) ergab sich zwischendurch auch einmal ein indifferentes bzw. negatives Verhalten der Acidität nach Mangeldurchblutung. Bei 4 weiteren Fällen blieb die sogenannte Hypoxämiereaktion gegen Ende des Versuches,

d. h. nach mehrfacher An- bzw. Hypoxämie aus oder es bestand ein Ausschlag nach der alkalischen Seite hin. Die isolierte Unterbindung der Art. hepatica hatte keinen Einfluß auf die Aciditätsverhältnisse des Magens.

Diskussion

Aus den Versuchsergebnissen geht hervor, daß eine Drosselung oder völlige Unterbindung der arteriellen Blutzufuhr in der Regel zu einem Temperaturabfall im Magen führt, obwohl das arterielle Blut kühler ist als das abfließende. Eine Erwärmung des durchfließenden arteriellen Blutes wiesen Horvath für die Niere sowie das Herz und Birnie für das Gehirn nach. Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß die Zunahme des arteriellen Blutstroms in den Abdominalorganen zu einer Temperaturerhöhung durch Steigerung des oxydativen Stoffwechsels führt. Den isolierten Temperaturabfall im menschlichen Magen bei Hungerschmerz beziehen Benjamin u. Mitarb. umgekehrt auf einen verminderten lokalen, oxydativen Stoffwechsel infolge spastischer Anämisierung der Magenschleimhaut.

Magen-, Rectal- und Lebertemperatur haben sich in unseren Versuchen schon zu Beginn um mehrere Zehntelgrade voneinander unterschieden. Das erscheint uns als ein weiterer Beweis dafür, daß die sogenannte Kerntemperatur im Gegensatz zur Auffassung von Spang keine einheitliche Größe ist.

Es mag einzuwenden sein, dieses Verhalten sei durch die experimentellen Bedingungen (Laparotomie) hervorgerufen worden. Dagegen läßt sich sagen, daß die genannten Differenzen noch 1—2 Std nach sorgfältigem Verschluß der Bauchdecken bestanden haben und daß sowohl der Magen als auch die Leber einer vorübergehenden Abkühlung bei der Laparotomie ausgesetzt waren.

Die Rectaltemperatur lag bei fast der Hälfte aller Versuchstiere am höchsten. Dieses Ergebnis findet eine Parallele in den Arbeiten von Eichna, der beim Menschen durch Messung mit intravasal liegenden Kathetern feststellte, daß die Rectaltemperatur alle, selbst die Lebervenentemperatur, um einen geringen Betrag übertrifft. Horvath u. Mitarb. konnten bei Tierversuchen die höchste Temperatur im Rectum, den Lebervenen und im Sinus coronarius feststellen. Sie lag höher als der in der Art. iliaca gemessene Wert.

Bis zu einem gewissen Grade gleichen sich die Temperaturunterschiede beim nichtoperierten Tier in Ruhe aus. Eine einheitliche, nur zur Körperschale gleichmäßig abfallende Kerntemperatur dürfte nicht völlig erreicht werden. Die als einheitlich gedachte Kerntemperatur stellt eine Vereinfachung dar, welche nur unter besonderen Gesichtspunkten zulässig ist. Bedeutungsvoller als die zu einem gewissen Zeitpunkt gemessene Temperaturdifferenz erscheint uns, daß die Richtung der Temperaturveränderungen an Magen, Leber und Rectum häufig nicht

gleichsinnig war. Wenn das Splanchnicusgebiet von einem Reiz (z. B. Wärme- oder Kälteapplikation auf die Bauchhaut) gleichmäßig getroffen wird, ist eine gleichsinnige Reaktion von Magen-, Leber- und Rectaltemperatur zu erwarten. Es gibt aber auch in der menschlichen Physiologie und Pathologie Gelegenheiten, bei denen einzelne Bauchorgane und deren Gefäße entweder von einem Reiz isoliert getroffen werden oder auf einen solchen infolge einer herabgesetzten Schwelle der Erregbarkeit besonders reagieren. Die Folge davon kann, wie aus unserem experimentellen Beispiel, dem Magen, hervorgeht, eine veränderte Eigentemperatur sein. Die Reduktion des arteriellen Blutstroms spielt beim Rückgang der Magentemperatur sicher eine wichtige Rolle. Unter gewissen Umständen halten wir es jedoch für möglich, daß infolge einer Störung des oxydativen Organstoffwechsels eine Erwärmung durch vermehrte arterielle Durchblutung ausbleibt. Geringe Temperaturschwankungen des Magens können zweifellos gelegentlich auch durch Wärmeleitung von einem benachbarten Organ her verdeckt werden. Magentemperatur und Magendurchblutung verhalten sich aber unseres Erachtens, wenn auch nicht in allen Fällen, so doch meistens gleichsinnig.

Wir weisen in diesem Zusammenhang auf die kürzlich erhobenen Befunde von Henning, Kimbel u. Kinzlmeier hin, die zeigten, daß sich der Gehalt mit radioaktivem Phosphor markierter Erythrocyten in der Magenschleimhaut nach Histamingabe erheblich verringert. Wir (Henning, Demling, Kinzlmeier) konnten schon vor Jahren feststellen, daß nach Histamin ein erheblicher Temperaturabfall an der Magenschleimhaut einsetzt. Allerdings muß bei der Verabreichung dieses Pharmakons auch mit einer vermehrten Wärmeabgabe an der Körperschale gerechnet werden (worauf Deutsch hingewiesen hat).

Der Abfall der Acidität nach völliger Unterbindung der Blutzufuhr im Magen ist bekannt und verständlich, wenn man annimmt, daß zur Bildung von Salzsäure im Magen Sauerstoff notwendig ist. Ebenso klar ist dementsprechend auch der neuerliche Anstieg der H-Ionenkonzentration bei normaler Durchblutung. Ungewöhnlich erscheint hingegen auf den ersten Blick die sogenannte Hypoxämiereaktion, d. h. der Anstieg der Acidität im relativen Sauerstoffmangel. Die Hypoxämie scheint einen Reiz für den Säureanstieg darzustellen, dessen Latenzzeit zwischen etwa 30 sec und 2 min schwankt. Der Effekt der örtlichen Mangeldurchblutung wird von einer Durchtrennung des Vagus nicht wesentlich beeinflußt.

Die Tatsache, daß die Hypoxämiereaktion bei einigen Versuchen „ermüdete", könnte dafür sprechen, daß nicht der Sauerstoffmangel oder der Kohlensäureüberschuß als solcher den Säureanstieg hervorruft, sondern zur Freisetzung einer (vielleicht histaminartigen) Substanz führt, die ihrerseits erst den adäquaten Reiz für die Belegzellen bildet. Ein gelegentlicher, flüchtiger Säureanstieg bei Anoxämie, den wir auch bei der ersten Versuchsreihe zweimal beobachtet hatten, kann dahingehend erklärt werden, daß im Gewebe noch ein geringer Sauerstoffvorrat vorhanden ist. Die völlige Unterbrechung der Blutzufuhr führt daher zuerst zu einem relativen

und dann zu einem völligen Sauerstoffmangel, d. h. das Stadium der Hypoxämie wird in unterschiedlicher Dauer vor der Anoxämie durchschritten und tritt gelegentlich durch Säureanstieg in Erscheinung. Ganz vereinzelt auftretender Säureabfall nach Hypoxämie besonders in den ersten Versuchen läßt sich am ehesten dadurch erklären, daß die Drosselung bis zum Stadium der optimalen Hypoxämie nicht in jedem Fall gelang. Wenn nach partieller Drosselung der arteriellen Blutzufuhr die Säure angestiegen war, so kehrte sie nach einiger Zeit in manchen Fällen zur Norm zurück. Eine weitere vorsichtige Reduktion ließ die Acidität neuerlich in

Abb. 4. Ulcerationen an der Magenschleimhaut des Kaninchens nach längerdauernder (3 mal 10 min) Mangeldurchblutung. (Zweifache natürliche Größe, Aufnahme in Durch- und Auflicht)

die Höhe schnellen. Der Säureanstieg wird offenbar hauptsächlich durch eine *plötzliche* Minderung des arteriellen Blutstromes hervorgerufen. Bemerkenswert erscheint uns ferner, daß eine Eröffnung der Klemme nach Hypoxämie zu einem Säureabfall führt, d. h. unter pathologischen Umständen kann eine verbesserte Blutzufuhr die Hyperacidität zum Verschwinden bringen (Abb. 3).

Wir konnten in einer Reihe von Fällen unter der Drosselung der Blutzufuhr die Entstehung akuter Ulcera beobachten. Es bedurfte dazu nicht der Anoxämie, vielmehr zeigten sich meistens mehrere tiefe, rundliche oder eckige, wie ausgestanzt wirkende Schleimhautdefekte schon nach wiederholter, drei- bis viermaliger Hypoxämie von etwa 10 min Dauer,

bei gleichzeitigem Säureanstieg. Wir konnten ferner beobachten, daß zwischen einzelnen Versuchstieren (es handelte sich nicht um Inzuchttiere) gewisse individuelle Unterschiede bestehen. Manche Kaninchen reagierten auf Mangeldurchblutung mit einer vorübergehenden Hyperacidität, die im Verlauf von 5, 10 oder 25 min wieder zur Norm zurückkehrte, während andere einen langdauernden, ständig zunehmenden H-Ionenanstieg zeigten.

Wir halten unsere Versuchsergebnisse für geeignet, zum Verständnis der Ulcusentstehung im menschlichen Magen beizutragen. Die spasmogene Theorie v. Bergmanns nimmt eine Ulcusentstehung infolge mangelnder Durchblutung der Magenschleimhaut an. Es ist allerdings hierbei an eine örtliche Ernährungsstörung und eine daraus folgende verminderte Resistenz gegen das Verdauungssekret gedacht worden. Auf Grund unserer Untersuchungen können wir aber annehmen, daß eine *akute* Minderdurchblutung des Magens gleichzeitig zur Entstehung einer Hyperacidität beiträgt. Auf diese Weise können die v. Bergmannsche Theorie und die Anschauung von der pathogenetischen Bedeutung der Hyperacidität bei Ulcusbildung auf *eine* Ursache zurückgeführt werden.

Hochrein u. Schleicher fanden bei vegetativ Stigmatisierten meistens Abfall der Magentemperatur und gleichzeitigen Aciditätsanstieg nach Kälteapplikation. Es wäre darüber hinaus denkbar, daß die nächtliche Dauersekretion (Henning u. Norpoth) bei Ulcuskranken zum Teil ihren Grund in einer während des Schlafes erhöhten Gewebsacidose hat. Den Anstoß zum Säureanstieg im Magen bei Mangeldurchblutung dürfte nicht der relative Sauerstoffmangel, sondern die Kohlensäureanhäufung geben. Nach Untersuchungen von Bornstein und Scheiner setzt Kohlensäure histaminartige Substanzen im Gewebe frei. Eine gewisse Sauerstoffmenge ist jedoch zur Bildung der H-Ionen unbedingt notwendig. Ob der Anstieg der Acidität unter Mangeldurchblutung auf einer vermehrten Produktion von H-Ionen beruht oder auf einer verminderten Abscheidung alkalischen Magenschleims sei dahingestellt. Nimmt man aber an, daß bei Mangeldurchblutung histaminartige Substanzen freigesetzt werden, dann ist die gesteigerte Bildung von H-Ionen wahrscheinlich. Nicht zu verwechseln mit der beschriebenen Hypoxämiereaktion ist das Verhalten des Magens bei niedriger Sauerstoffspannung (Unterdruckkammer, Anämie). Hierbei nimmt im Gegensatz zu unseren Versuchen die Kohlensäurespannung durch Hyperventilation im Blut und in den Geweben ab, das Blut-p_H steigt an und die HCl-Produktion sinkt.

Zusammenfassung

An Kaninchen wurde die Abhängigkeit der Magentemperatur und der Acidität von der arteriellen Durchblutung geprüft. Die Verminderung oder Drosselung der arteriellen Blutzufuhr rief in den meisten Fällen einen isolierten Temperaturabfall am Magen hervor. Akute Mangeldurchblutung führte darüber hinaus zu einem deutlichen Anstieg der Acidität an der Magenschleimhaut. Dieses Verhalten änderte sich nicht nach Vagusdurchtrennung. Auf die mögliche Bedeutung der Befunde für die Klinik wird hingewiesen.

Literatur

Benjamin, H. B., M. Wagner and W. Zeit: Surgery **97**, Nr. 1 (1953). — Birnie, J. H., and J. Grayton: J. of Physiol. **110**, 189 (1952). — Bornstein, A.: Z. Kreislaufforsch. **1931**, H. 5, 129. — Demling, L.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **1954**, 557. — Demling, L., u. J. Zach: Klin. Wschr. **1954**, 1056. — Deutsch, E.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 1953. — Eichna, L. W., A. R. Berger, B. Rader and N. H. Becker: J. Clin. Invest. **30**, Nr. 4 (1951). — Henning, N., K. H. Kimbel u. H. Kinzlmeier: Gastroenterologia (Basel), im Druck. — Henning, N., u. L. Norpoth: Arch. Verdgskrkh. **53**, 64 (1932). — Hochrein, M., u. J. Schleicher: Dtsch. med. Wschr. **1948**, 161. — Horvath, St. M., A. Rubin and E. L. Foltz: Amer. J. Physiol. **161**, 316 (1950). — Patterson, W. B., De Witt and Stetten: Science (Lancaster, Pa.) **109**, 256 (1949). — Scheiner, H.: Z. physik. Ther. **42**, 25 (1932). — Schwiegk, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **168**, 693 (1932). — Spang, K., V. Obrecht u. W. Ey: Klin. Wschr. **1952**, 210.

Dozent Dr. L. Demling, Med. Klinik d. Universität Erlangen

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 519—521 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky)

Der histochemische Nachweis von Cholinesterase im Hühneramnion

Von

W. Hoefke und H. Lüllmann

(Eingegangen am 19. Dezember 1955)

In früheren Untersuchungen (Kuschinsky, Lüllmann u. Muscholl) konnte im Amnion des 7—9 Tage bebrüteten Hühnerembryos mit mikromanometrischer Methodik (nach Linderstrøm-Lang u. Holter) Cholinesterase nachgewiesen werden. Die Esterase spaltete Acetylcholin und Acetyl-β-methylcholin, war aber nicht in der Lage, Benzoylcholin zu hydrolysieren. Auf Grund dieser Eigenschaften mußte die Cholinesterase nach der Definition von Augustinsson u. Nachmansohn als Acetylcholinesterase (echte Esterase) angesehen werden.

Histologisch besteht das Amnion aus einer Epithellage, der Zwischenmembran und einer Lage glatter Muskelzellen. Vom Ende des 4. Bebrütungstages ab lassen sich nach Verzàr sowie Bautzmann u. Schröder die Muskelzellen sicher gegen das Mesenchym abgrenzen. In dieser Muskellage kann man bald darauf die ersten „Muskelsterne" erkennen und etwa vom 8. Tage an beginnt der Umbau zu einer 2schichtigen Muskellage. Die Nervenfreiheit dieses glattmuskeligen Organs konnte immer wieder bestätigt werden (Verzàr, Péterfi, Stöhr jr. u. Bautzmann).

Wir versuchten, mit der histochemischen Methode von Koelle in der Modifikation von Gerebtzoff die Lokalisation des Fermentes festzustellen. Es wurden Amnien vom 5.—11. Bebrütungstage verwandt. Spätere Stadien wurden nicht berücksichtigt, da es nicht mit Sicherheit gelingt, die Verwachsungen zwischen Amnion und Allantois zu lösen. Das Amnion wurde nach dem Vorschlag von Baur isoliert und in 5% neutraler Formaldehydlösung fixiert. Die so gewonnenen Häutchenpräparate wurden mit den Substraten Acetylthiocholin[1] und Butyrylthiocholin[1] 30—240 min inkubiert. Die Inkubationslösungen waren mit Natriumacetat/Essigsäurepuffer auf p_H 6,8 eingestellt. Ein Teil der Präparate

[1] Für die freundliche Überlassung von Versuchsmengen danken wir der Deutschen Hoffmann La Roche AG., Grenzach; für die Überlassung von Glykocoll der Firma E. Merck, Darmstadt.

wurde vor der Inkubation 30 min in eine Eserinlösung (2×10^{-4} g/ml) eingelegt.

Sowohl mit Acetylthiocholin als auch mit Butyrylthiocholin ließen sich in den Muskelzellen die Reaktionsprodukte der hydrolysierten Substrate nachweisen. Die Reaktion war sehr schwach, erst nach 2 bis 3 Std Inkubationsdauer konnten die CuS-Niederschläge sicher lokalisiert werden. Nach vorheriger Eserinbehandlung war die Reaktion unterdrückt. Die bräunlichen CuS-Niederschläge lagern sich der Kernmembran an. Diese wahrscheinlich als Diffusionseffekt zu deutende Anlagerung an den Kern ist von Koelle und von Gerebtzoff bereits an anderen Organen bemerkt worden. Auf Grund dieser Tatsache läßt sich nur angeben, daß Cholinesterase in der Zelle vorkommt, und nicht wie im Skeletmuskel an einer eng begrenzten Stelle der Zellmembran. Ihre genaue Lokalisation innerhalb der Zelle konnte nicht festgestellt werden.

Die Frage, um welchen Typ von Esterase es sich handelt, konnte nicht entschieden werden. An anderen Objekten vermag die echte Esterase nur Acetylthiocholin, die Pseudoesterase auch Butyrylthiocholin zu spalten. Am Amnion war mit beiden Substraten eine positive Reaktion zu erzielen. Durch die Hemmbarkeit mit Eserin kann keine Entscheidung über die Spezifität des Fermentes getroffen werden, da beide Esterasen etwa in gleichem Ausmaß beeinflußt werden. Aus der Einteilung der Cholinesterasen in 2 verschiedene Gruppen (Acetylcholin- und Butyrylcholin- bzw. Pseudocholinesterasen) läßt sich über deren Spezifität keine sichere Aussage machen, da aus verschiedenen Arbeiten der letzten Jahre hervorgeht, daß sowohl Acetylcholin- als auch Butyrylcholinesterasen aus verschiedenen Organen verschiedener Tiere unterschiedliche Eigenschaften haben (vgl. Augustinsson). Im Gegensatz zur menschlichen Pseudocholinesterase vermag nach Untersuchungen mit manometrischer Methodik von Earl u. Thompson und von Myers die Pseudocholinesterase des Huhnes Acetyl-β-methylcholin zu spalten. Es erscheint daher auch ein abweichendes Verhalten bei der histochemischen Reaktion möglich.

Zusammenfassung

Die mikromanometrisch im Hühneramnion nachgewiesene Cholinestarese kann histochemisch in den glatten Muskelzellen lokalisiert werden. Unter den angegebenen histochemischen Versuchsbedingungen werden Acetylthiocholin und Butyrylthiocholin gespalten.

Literatur

Augustinsson, K. B.: Neuere Ergebnisse auf dem Gebiet der Cholinesterase und ihre Bedeutung für Pharmakologie und Toxikologie. Arzneimittel-Forsch. 4, 242 (1954). — Augustinsson, K. B., and D. Nachmansohn: The distinction between acetylcholinesterase and other choline ester splitting enzymes. Science

(Lancaster, Pa.) **110**, 98 (1949). — Baur, M.: Versuche am Amnion von Huhn und Gans (Pharmakologische Untersuchungen an einem nervenfreien glatten Muskel). Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **134**, 49 (1928). — Bautzmann, H., u. R. Schröder: Amnionstudien zur vergleichenden Histogenese, Struktur und Funktion des Amnions beim Hühnchen und beim Menschen. Anat. Anz. Erg. Heft **100**, 135 (1953). — Studien zur funktionellen Histologie und Histogenese des Amnions beim Hühnchen und beim Menschen. Z. Anat. **117**, 166 (1953). — Cavanagh, J. B., R. H. S. Thompson and G. R. Webster: The localization of pseudocholinesterase activity in nervous tissue. Quart. J. Exper. Physiol. **39**, 185 (1954). — Earl, C. J., and R. H. S. Thompson: The inhibitory action of tri-o-cresyl-phosphate on cholinesterases. Brit. J. Pharmacol. **7**, 261 (1952). — Gerebtzoff, M. A.: Recherches histochimiques sur les acétylcholine- et choline-estérases: I. Introduction et technique. Acta Anat. **19**, 366 (1953). — La localisation histochimique des cholinestérases hépatiques. C. r. Soc. Biol. (Paris) **148**, 397 (1954). — Holter, H.: Technique of the Cartesian diver. C. r. Trav. Labor. Carlsberg, Ser. chim., **24**, 399 (1943). — Koelle, G. B.: The histochemical differentiation of types of cholinesterases and their localizations in tissues of the cat. J. Pharmacol a. Exper. Ther. **100**, 158 (1950). — The elimination of enzymatic diffusion artifacts in the histochemical localization of cholinesterases and a survey of their cellular distributions. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **103**, 153 (1951). — Kuschinsky, G., H. Lüllmann u. E. Muscholl: Untersuchungen über die Einwirkung von verschiedenen Pharmaka auf die Spontanrhythmik des isolierten Hühneramnion. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 369 (1954). — Linderstrøm-Lang, K.: On the theory of the cartesian diver micro respirometer. C. r. Trav. Labor. Carlsberg, Ser. chim. **24**, 333 (1943). — Myers, D. K.: Biochemic. J. **55**, 67 (1953), zit. nach Cavanagh et soc. — Péterfi, T.: Beiträge zur Histologie des Amnions und zur Entstehung der fibrillären Strukturen. Anat. Anz. **45**, 161 (1913). —Stöhr, Ph. jr.: zit. nach Baur, M. — Verzàr, F.: Über die Anordnung der glatten Muskelzellen im Amnion des Hühnchens. Internat. Mschr. Anat. u. Physiol. **24**, 292 (1908). — Über glatte Muskelzellen mit myogenem Rhythmus. Pflügers Arch. **158**, 419 (1914).

Dr. W. Hoefke und Dr. H. Lüllmann, Mainz, Pharmakologisches Institut der Universität

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 522—527 (1956)

Aus dem Pharmakologischen und dem Pathologisch-anatomischen Institut der Medizinischen Fakultät in Sarajevo

Histamin im Entzündungsprozeß

Von

P. Stern, A. Nikulin, A. Misirlija und M. Ciglar

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. Dezember 1955)

Die Bedeutung des Histamins (H) im Entzündungsprozeß ist schon seit Jahrzehnten im Mittelpunkt der Forschung.

Die Einführung der Antihistaminica ermöglichte ein erfolgreicheres und eingehenderes Studium des H-Stoffwechsels, als es bis dahin der Fall war, und bestätigte die Bedeutung von H für die physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge[1]. Die Arbeiten von Lewis[9] haben zweifellos schon vor 30 Jahren auf die große Aufgabe hingewiesen, die H in der Haut erfüllt, was später von vielen Verfassern bestätigt wurde[14]. Eppinger hat in seinem Werke „Permeabilitäts-Pathologie" die Rolle des H im Entzündungsprozeß, bzw. die Wirkung dieses biogenen Amins auf die Capillarpermeabilität besonders ausführlich und eingehend erklärt[4].

Wir haben gezeigt, daß die Wirkung von H auf die Capillarpermeabilität und die Zellmembran nicht die gleiche ist[16]. Nach unseren Befunden wirkt H im Sinne einer Permeabilitätsverminderung der Zellmembran. Jedenfalls steht die Rolle des H in der Entzündung, wegen des eben genannten Effektes auf die Capillaren, außer Zweifel.

Die „Granulom-Beutel"-Methode von Selye[15] gab die Möglichkeit der quantitativen Erforschung der bei der Entzündung teilnehmenden Faktoren, in erster Linie bei der Hautentzündung. Fast bei allen Tieren ist H in der Haut relativ am reichsten enthalten, so auch bei der Ratte[11].

Die Einführung der Histamin-Liberatoren (HL) in die experimentelle Medizin[10] ergab neue glänzende Möglichkeiten in der Erforschung des H-Stoffwechsels, noch bessere als die der Antihistaminica. HL entleeren gerade die Rattenhaut am leichtesten von H[2]. Die genannte „Granulombeutel"-Methode, sowie die Anwendung von HL erlaubte uns die Erforschung der Aufgabe des H in diesem Organ, und zwar unter gewöhnlichen Umständen, sowie in der von H entleerten Haut. Antihistaminica sind nur imstande die H-Wirkung zu verhindern, jedoch nicht seinen Gehalt im Organismus herabzusetzen[3], wie dies durch die HL erreicht wird. Darin liegt ihr großer Vorteil.

Methode. Wir verwendeten die „Granulombeutel"-Methode genau nach der Vorschrift von Selye[15] an weißen Ratten beider Geschlechter von 95—120 g Gewicht. In den durch 25 cm³ Luft geschaffenen Beutel wurde 1,0 cm³ 1% Oleum

Crotonis injiziert. Die Tiere wurden in Gruppen zu je 3 Kontrolltieren und 3 weiteren, die HL erhielten, eingeteilt. 24 Std nach der Injektion und jeden folgenden Tag bis zum 5. wurde eine Doppelgruppe geopfert, jedoch am 6. Tag 9 Kontrollen und 9 Versuchstiere mit HL. Am 6. Tag war die Entzündung im Beutel zu maximaler Entwicklung gelangt. Als HL gebrauchten wir die Substanz 48/80* i. m., und zwar den ersten Tag 150 γ/Tier und jeden folgenden Tag 50 γ mehr bis zu 350 γ, welche Dosis bis zum Ende des Versuches eingehalten wurde. Am 7. Tag der HL-Verabreichung wurde der Granulombeutel erzeugt und HL weiter verabreicht. Die vorhergehende Verabreichung unternahmen wir deshalb, weil nach Feldberg die Haut sich am 3.—4. Tag der Verabreichung von 48/80 maximal von H entleert[5]. Demnach wurde in unserem Versuch die Entzündung in der schon von H entleerten Haut hervorgerufen.

Für die pathologisch-mikroskopische Untersuchung wurden Teile der Beutelwand herausgeschnitten, nach vorhergehender Fixierung in 4% igem Formalin und Paraffineinbettung geschnitten und nach dem Standardverfahren mit Hämalaun-Eosin gefärbt. Einige Schnitte wurden auch nach der Fixierung in Carnoyscher Flüssigkeit für die Fluorescenzmikroskopie fertiggestellt[7].

Die Serie der mit HL behandelten Ratten zeigte folgende Änderungen: Nach 24 Std ist am Rande des Beutels das subcutane Bindegewebe etwas aufgelockert. Die Fasern und Fettzellen sind leicht auseinandergeschoben, zwischen ihnen sieht man zahlreiche kleine, mit Eosin rosa gefärbte Eiweißkörnchen. In Präparaten, die nach der Haitingerschen Methode I bereitet wurden, fluorescierten diese Körnchen rötlich-braun, was ebenfalls für ihre Abstammung von den Proteinen des Blutplasma spricht. Das Gewebe der Beutelwand ist mit einer Schicht polymorphonuclearer und eosinophiler Leukocyten durchzogen. Darunter findet man auch einzelne lymphocytäre Elemente. In den tiefern Schichten, die der Rückenmuskulatur der Ratte anliegen, ist die entzündliche Exsudation weitaus stärker und die Entzüngungszellen befinden sich auch zwischen den Muskelfasern.

48 Std nach Anwendung von Ol. Crotonis zeigen sich im Exsudat auch einzelne jüngere Bindegewebselemente, die sich den schon beschriebenen Zellenelementen des ersten Tages anschließen.

Im Laufe der folgenden, bis zum 6. Tage, entwickeln sich fortschreitend die produktiven Änderungen im Entzündungsgebiet. Die Leukocyten sind noch immer in ziemlich großer Zahl vorhanden, doch fallen fibrilläre Bindegewebselemente und Gefäßprozesse auf, die neben den jungen Bindegewebszellen eine Organisation des Exsudates anzeigen.

Bei Ratten der Kontrollserie, die vor der Anwendung von Ol. Crotonis *kein* HL 48/80 erhielten, ist das Bild dem ersten Tag sehr ähnlich. Vielleicht hat es stellenweise den Anschein, daß etwas mehr eiweißreiche

---

* Herrn Prof. Dr. W. Feldberg, London, und den Wellcome Physiological Research Laboratories, Langley Court, Beckenham, Kent, danken wir bestens, daß sie uns die Substanz 48/80 freundlichst zur Verfügung gestellt haben. Substanz 48/80 ist ein Kondensationsprodukt von p-Methoxyphenyläthylmethylamin mit Formaldehyd. Es kann kürzere oder längere Moleküle bilden.

Flüssigkeit zwischen den Bindegewebselementen vorhanden ist. Im Laufe der folgenden Tage ändert sich das Bild und zeigt bedeutende Unterschiede gegenüber den entsprechenden Ratten der ersten Serie. Man findet umfangreiche Rückbildungsprozesse bis zur Nekrose an den leukocytären Elementen und an den kollagenen Fasern des subcutanen Gewebes. Quantitativ betrachtet ist die Zahl der polymorphonuclearen

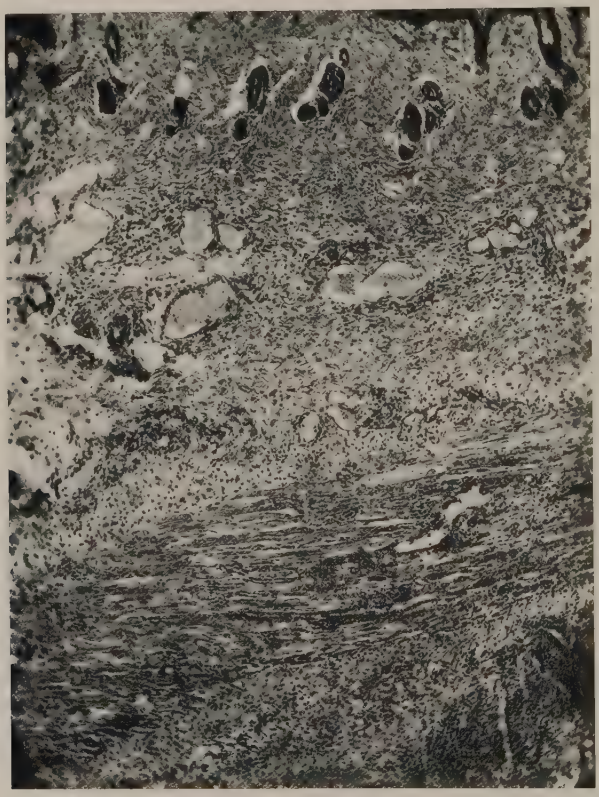


Abb. 1. Granulombeutel einer nach 2 Tagen geopferten Ratte

und eosinophilen Leukocyten bedeutend größer als bei den Ratten der ersten Serie.

Zum Auftreten der produktiven Elemente (Blutgefäße und Fasern) kommt es nicht so früh, und wenn nach 3—4 Tagen solche Erscheinungen zutage treten, so sind sie bei weitem nicht von solchem Umfang wie bei den dehistaminierten Ratten. Ein solcher an produktiven Vorgängen armer Zustand bleibt bis zum 6. Tag erhalten. Durch vergleichende Untersuchungen der beiden Serien wird der Eindruck gewonnen, daß der qualitative Umschwung, der zu Unterschieden zwischen den

Exsudaten der beiden Serien führt, im Zeitabschnitt des 2.—3. Tages nach Beginn der Entzündung erfolgt.

Wie aus den Abbildungen zu sehen ist, zeigt sich die Entzündung in der Haut von Ratten, die HL erhielten, viel schwächer als bei den Kontrollen. Als Beispiel in den Abbildungen haben wir Tiere genommen, die am 2. Tag geopfert wurden. Erst nach 40 Tagen kehrt der H-Gehalt

Abb. 2. Granulombeutel einer Ratte, die HL erhielt und nach 2 Tagen geopfert wurde

wieder auf den Anfangswert zurück[5]. Doch muß erwähnt werden, daß auch mittels dieses wirksamsten HL 48/80 die Haut nicht restlos von H entleert werden kann. Etwa 10% bleiben noch immer anwesend[2]. Wir haben jedoch trotzdem das erwartete Resultat, d. h. eine verminderte entzündliche Reaktion, erhalten. Wir stimmen der Meinung von Ungar[20] zu, daß H nicht allein für die entzündliche Reaktion verantwortlich ist; doch ist seine Rolle jedenfalls bedeutend, wie wir aus diesen Versuchen sehen. Dies spricht gegen die Auffassung von Mayer[12], daß H nur eine sekundäre Rolle während der stärksten Entwicklung der Entzündung spielt. Er glaubt, daß es nur zu Beginn des Prozesses wesentlich ist, z. B.

beim Erythem. Er studierte die allergische Entzündung, hervorgerufen mit Paraphenylendiamin. Wir haben eine verminderte entzündliche Reaktion zwar schon 48 Std nach Beginn der Entzündung, aber auch am 6. Tag erhalten.

Einer von uns hat gezeigt, daß die Azulene die Ausschüttung von H bei der Reaktion Antigen-Antikörper verhindern[17], und es ist bekannt, daß *sie auch eine antiphlogistische Wirkung haben*[8], was mit unseren hier dargelegten Versuchen übereinstimmt. Ebenso konnten wir vor kurzer Zeit zeigen, daß die Haut des Meerschweinchens, die mittels des genannten HL von H entleert worden ist, gegen 2,4-dinitrochlorbenzol nicht mehr ekzematös reagiert[18]. Die Tuberkulinreaktion entwickelt sich auch weiterhin mit ungeschwächter Intensität, unabhängig von dem H-Gehalt der Haut[13].

Man sieht, daß H eine entscheidende Rolle im morphologischen Bild der allergischen, sowie der einfachen Entzündung spielt. Es ist klar, daß H den Mechanismus des entzündlichen Vorganges, bzw. der Allergie durch die Wirkung auf die Capillarpermeabilität beeinflußt, die morphologischen Veränderungen sind nur der Ausdruck dieser Wirkung. Als Beweis für diese These führen wir abermals an, daß Azulene, die die H-Ausschüttung verhindern, zugleich eine antiallergische und eine antiphlogistische Wirkung haben. Die letztere wurde ebenfalls am Granulombeutel bewiesen[19].

Brock u. Mitarb.[1a], sowie auch Oettel u. Mitarb.[1b] lehnen den antiphlogistischen Effekt der Azulene ab und sind der Ansicht, daß die von Heubner[8] verwendete Senfölchemosis-Methode nicht genug überzeugend ist. Wir haben jedoch unsere Versuche über diese Azulenwirkung an der Granulombeutel-Methode unternommen, die unserer Meinung nach einen bei weitem spezifischeren Test als die Senfölchemosis-Methode darstellt.

Zusammenfassung

Wird die Haut der Ratte vor Erzeugung des Granulombeutels mittels Histamin-Liberator 48/80 maximal von H entleert, so erscheint die entzündliche Reaktion im Vergleich zu den Kontrollen bedeutend schwächer.

Literatur

[1a] Brock, N., J. Kottmeier, D. Lorenz u. H. Weigel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 450 (1954). — [1b] Oettel, H., u. G. Kollmannsperger: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 473 (1955). — [2] Brocklehurst, W. E., J. H. Humphrey and W. L. M. Perry: J. of Physiol. **129**, 205 (1955). — [3a] Bucher, K.: Helvet. physiol. Acta **6**, 114 (1948). — [3b] Lence, P., N. Marijan, M. Predojevic u. P. Stern: Acta med. Jug. **3**, 245 (1948). — [4] Eppinger, H.: Permeabilitäts-Pathologie. Wien: Springer 1949. — [5] Feldberg, W., and J. Talesnik: J. of Physiol. **120**, 550 (1953). — [6] Haas, H.: Histamin und Antihistamine. Aulendorf: Editio Cantor 1951. — [7] Haitinger, M.: Fluorescenz-Mikroskopie, Leipzig 1938. — [8a] Heubner, W., u. F. Grabe: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **171**, 329 (1933). — [8b] Heubner, W., u. W. Albath: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **192**, 383 (1939). — [8c] Koch, W.: Hippokrates **1953**, 698. — [9] Lewis, T.: Die Blutgefäße der menschlichen Haut und

ihr Verhalten gegen Reize. Berlin: S. Karger 1928. — [10a] MacIntosh, F., and W. Patton: J. of Physiol. **109**, 190 (1949). — [10b] Patton, W.: Brit. J. Pharmacol. **6**, 499 (1951). — [11] Martin, J., u. A. Valenta: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **193**, 305 (1939). — [12] Mayer, R. L.: Annals of the New York Academy of Sciences **52**, 1041 (1950). — [13] Misirlija, A., P. Stern, Huković, S.: X. Jugoslav. Phtysiologenkongreß Sarajevo 1955. — [14a] Nilzen, A.: Studies in Histamine, Acta dermat-vener. (Stockh.), supp. **17** (1947). — [14b] Haxthausen, H.: Fortschritte der Allergielehre II. Basel, New York: S. Karger 1949. — [14c] Parrot, J. L., et J. Reuse: J. de Physiol. **46**, 99 (1954). — [15] Selye, H., and A. Horava: Second annual Report on Stress. Montreal: Acta Inc. Publ. 1952. — [16] Stern, P., u. R. Košak: Acta med. Jug. **5**, 147 (1951). — [17] Stern, P.: Erster internationaler Allergiekongreß, Zürich. Basel, New York: S. Karger 1951. — [18] Stern, P.: Arch. internat. Pharmacodynamie: im Druck. — [19] Stern, P.: Medicinski pregled. Im Druck. — [20] Ungar, G.: Lancet **1952**, 742.

Prof. Dr. P. Stern, Sarajevo/Jugoslawien, Pharmakologisches Institut

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 528—537 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. F. Hahn)

Über die Wirkung krampfhemmender Substanzen auf die elektrischen Erscheinungen im corticalen Strychnin-Focus

Von

F. Hahn, A. Oberdorf und W. Rummel

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 13. Dezember 1955)

Zur pharmakologischen Prüfung krampfhemmender Substanzen finden gegenwärtig fast ausschließlich der Elektroschock und der Cardiazolschock Verwendung ([8, 9, 13, 14, 15, 25, 27, 28, 29]). Beide Verfahren messen die Wirkung der Stoffe auf generalisierte Krampfzustände. Demgegenüber haben wir[5] schon vor längerer Zeit vorgeschlagen, zur Auswertung antiepileptischer Stoffe den corticalen Strychninfocus heranzuziehen. Dieses Verfahren kann als Modell für jene cerebralen Anfallsleiden bei Menschen dienen, bei denen ein Krampffocus in der Rinde in Betracht kommt, nicht nur bei symptomatischer, sondern auch bei genuiner Epilepsie ([11, 12, 19, 20, 22, 23]). Da die von dem Strychninfocus ableitbaren Krampfströme nach Frequenz und Amplitude leicht fortlaufend zu registrieren sind[23], so ist es ein weiterer Vorteil unseres Vorgehens, daß mit ihm die Beeinflussung der elektrischen Vorgänge durch die Antiepileptica im Krampfherd selbst gemessen werden kann.

Unsere ersten Versuche[5] haben gezeigt, daß es grundsätzlich mit verschiedenen Antiepileptica (Luminal, Prominal, Diphenylhydantoin und Mesantoin) wie auch anderen Narcotica (Veronal) bei ausreichender Dosierung möglich ist, die Amplitude der Krampfströme herabzusetzen. Es zeichneten sich auch bereits Unterschiede zwischen den Antiepileptica ab, wobei besonders die starke Wirkung des Diphenylhydantoins und mehr noch des Mesantoins auf die Amplitude auffielen.

In der vorliegenden Arbeit versuchten wir durch Heranziehung niedrigerer Dosen die Unterschiede zwischen zwei typischen antiepileptischen Stoffen verschiedener Klassen, nämlich Luminal und Diphenylhydantoin, noch klarer herauszuarbeiten, wobei es uns besonders darauf ankam, die Wirkung auf die Amplitude zur gleichzeitigen Wirkung auf die Frequenz in Beziehung zu setzen. Klinisch wie experimentell sind zwischen diesen beiden Stoffen Wirkungsunterschiede gefunden

worden[1, 2, 3, 15, 16, 18, 30, 32], für die wir auf diese Weise eine weitere Aufklärung erhofften. Als Vergleichsstoffe mit klinisch nicht verwertbarer antiepileptischer Wirkung dienten uns die Narcotica Chloralose und Evipan.

Methodik

An 29 Katzen in Evipan-Natrium-Narkose (50 mg/kg i.v.) wurde das knöcherne Schädeldach freigelegt und ein Bohrloch von 10 mm Durchmesser angebracht, dessen Mittelpunkt in allen Versuchen 10 mm vor dem Tentorium und gleichfalls 10 mm lateral (meist rechts) der Sagittalnaht lag. Nach vorsichtiger Abtragung der Dura in der Mitte des Bohrlochs in einer Ausdehnung von etwa 4—6 mm² wurde ein diese Duraöffnung gut überdeckendes Filterpapierblättchen aufgelegt und anschließend ein mit einem kleinen Strychninkristall (1—2 mg Strychnin. nitric.) präparierter und in das konische Bohrloch genau passender Elektrodenpfropf eingesetzt. Abb. 1 zeigt in schematischer Darstellung die Konstruktion dieses Elektrodenpfropfes und seine Lage im Versuch.

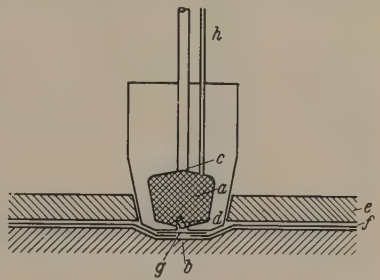


Abb. 1. Konischer Elektrodenpfropf aus Trolon-Kunstharz und seine Lage während des Versuchs. Der Hohlraum *a* ist mit Watte ausgefüllt, die mit Ringer-Lösung getränkt wird und so die elektrische Verbindung zwischen der eigentlichen Ableitfläche *b* der Hirnrinde und der Ableitelektrode *c* herstellt. In der Öffnung des Pfropfens über der Ableitfläche liegt das Strychninkristall *d*, *e* Schädeldach. *f* Dura, *g* Filterpapier, *h* Druckausgleich

Durch die gewählte Anordnung sollte in Modifikation des von Kornmüller u. Noell[23] angegebenen Vorgehens erreicht werden, daß praktisch kein Strychnin in Lösung auf Rindenanteile außerhalb der Ableitfläche gelangen konnte und daß die Lage bedingungen der Ableitelektrode und die wirksame Strychninkonzentration weitgehend konstant blieben.

Die Ableitung der Krampfströme von dem auf diese Weise erzeugten Focus, der regelmäßig etwa 3—5 min nach Anbringung der Elektrode aktiv wurde, erfolgte unipolar gegen eine geerdete Schraubenelektrode in der Mitte der von Haut und Periost ebenfalls befreiten Nasenwurzel.

Je eine weitere Schraubenelektrode befand sich auf der Gegenseite symmetrisch zur Focuselektrode, bzw. 15—20 mm vor dieser. Ihre Ableitungen waren ebenfalls unipolar gegen die Nasenwurzel geschaltet und dienten in erster Linie zur Kontrolle dafür, ob die Krampfstromeinzelabläufe (KSE) lokalisiert blieben oder sich ausbreiteten. Ferner wurde eine kleine Plattenelektrode subcutan an der Ohrmuschel versenkt, die lediglich zur Erdung diente.

Die Ableitungen kamen auf einem Schwarzer-Elektroencephalographen* zur Registrierung, dessen Zeitkonstante und Störblende so eingestellt waren, daß Frequenzen zwischen 2 und 70 Hz ohne Amplitudenverlust aufgezeichnet wurden.

Jeweils während der Dauer eines Versuches wurde das Tier nach Einbinden einer Trachealkanüle in konstanter Weise künstlich beatmet in der Absicht, die durch Änderung der Spontanatmung unter Injektion der zu prüfenden Substanzen möglicherweise beeinflußbare Focusaktivität vor solchen Einwirkungen zu sichern ([23, 24, 26]). Die Injektionen erfolgten in die V. femoralis. Luminal wurde als

* Für die Überlassung dieses Gerätes sei der Deutschen Forschungsgemeinschaft auch an dieser Stelle herzlichst gedankt.

Natriumsalz in frisch bereiteter 5%iger Lösung verwendet. Diphenylhydantoin wurde ebenfalls 5%ig gelöst, indem zu 500 mg Substanz 1 cm³ 2 n-NaOH zugegeben und unter Erwärmung (bis 60°) mit Aqua dest. auf 10 cm³ aufgefüllt wurde. Evipan in Form des Natriumsalzes wurde in 10%iger Lösung verwendet, Choralose in Aqua dest. unter Erwärmung 0,7%ig gelöst.

Folgende Dosen wurden untersucht: Luminal-Na 20 und 40 mg/kg, Diphenylhydantoin 10 und 20 mg/kg, ferner Chloralose und Evipan-Na je 25 mg/kg.

Obgleich während der Versuche häufig auch zwischen den Injektionen die Focusaktivität registriert wurde, erwies es sich bei der Auswertung als zweckmäßig, jeweils nur eine Ausgangswertperiode vor und eine Reaktionsperiode nach der Injektion zu berücksichtigen. Während der Injektionen, die im Mittel etwa 50 sec dauerten, entsprachen die registrierten Werte durchweg praktisch denen der Ausgangswertperioden, so daß sie bei der Auswertung unberücksichtigt bleiben konnten. Die Frequenzangaben sind Durchschnittswerte der gesamten jeweiligen Beobachtungsperiode. Die Amplitudenangaben wurden durch Ausmessen der Einzelwerte während 50 sec unmittelbar vor der Injektion bzw. am Ende der Nachbeobachtungsperiode und durch Errechnung des arithmetischen Mittels gewonnen. Stichproben zur Sicherung der Amplitudenangaben durch Auswertung mehrer 50 sec-Abschnitte hintereinander zeigten eine bemerkenswerte Konstanz der Mittelwerte, auch wenn die Gruppen der Einzelwerte erhebliche Streuung aufwiesen. Von insgesamt 104 Einzelreaktionen mit den untersuchten Substanzen waren 42 nicht auswertbar, davon 40 deshalb, weil die KSE-Ausgangsfrequenz unter 20/min lag. Wir wählten diesen Wert als Grenze, weil er noch eine zuverlässige Frequenz- und vor allem Amplitudenauswertung ermöglichte.

Zur statistischen Auswertung der gewonnenen Ergebnisse verwendeten wir die graphische Methode von Daeves u. Beckel[4]. Sie hat neben der leichten Handhabung den Vorzug, auch für asymmetrische Verteilungen brauchbar zu sein, für die die üblichen Verfahren der Variationsstatistik streng genommen nicht anwendbar sind und daher leicht zu falscher Beurteilung führen können. Die graphische Darstellung von Befunden nach ihrer Summenprozentverteilung im Wahrscheinlichkeitsnetz mit logarithmischer Merkmalsteilung ermöglicht die Feststellung eines Mittenwertes C und der Grenzen des asymmetrischen Bereiches g_5 und g_{95}, innerhalb deren 90% der Werte eines Kollektivs liegen. Aus C, g_5 und g_{95} wird der Streufaktor g_s ermittelt. Zwischen den genannten Größen bestehen folgende mathematischen Beziehungen:

$$C = \sqrt{g_5 \cdot g_{95}}$$

$$g_s = \frac{g_{95}}{C} = \frac{C}{g_5} \quad .$$

Die Kennwerte eines Kollektivs werden durch $C \cdot g_s^{\pm 1}$ angegeben. Dieses Verfahren läßt unmittelbar erkennen, ob die gefundenen Kennlinien zweier zu vergleichender Kollektive sich berühren oder überschneiden. Wenn dies nicht der Fall ist, liegen tatsächlich verschiedene Kollektive vor. Nach Angaben von Daeves u. Beckel sind dann nähere Angaben zu dieser Verschiedenheit, vergleichbar etwa der signifikanten Differenz der Variationsstatistik, nicht erforderlich.

Ergebnisse

In Tab. 1 sind für alle untersuchten Substanzen die Ergebnisse der ausgewerteten Einzelreaktionen zusammengestellt hinsichtlich ihrer Wirkung auf KSE-Frequenz/min und der elektronegativen Amplitude (mV) der Spikes. Tab. 2 enthält die durch Auswertung dieser Einzelwerte

Tabelle 1. *Ausgangs- und Reaktionswerte der KSE-Frequenz/min und der Spike-Amplitude sowie Zeitabschnitte für Ausgangs-, Injektions- und Reaktionswertperioden*

	Nr.	KSE-Frequenz/min		KSE-Amplitude (mV)		Dauer (sec)		
		Ausg.-W.	Reakt.-W.	Ausg.-W.	Reakt.-W.	Ausg.-W.	Inj.-W.	Reakt.-W.
Luminal-Na 20 mg/kg	1	29,3	28,3	1,5	1,8	241	63	182
	2	27,0	26,6	1,5	1,3	191	44	300
	3	39,4	36,1	2,5	2,5	178	37	312
	4	59,7	56,0	1,9	1,7	152	37	214
	5	65,1	51,1	1,9	1,6	196	37	162
	6	57,2	39,4	1,6	1,4	156	51	199
	7	27,3	27,5	2,1	2,3	171	35	226
	8	46,1	45,1	6,5	5,9	255	55	168
	9	44,1	37,2	5,3	4,6	102	48	206
	10	36,9	32,2	4,2	4,2	135	37	161
Evipan-Na 25 mg/kg	1	36,9	12,4	2,1	2,3	74	62	131
	2	36,5	5,9	2,6	2,8	165	67	166
	3	43,8	23,3	2,4	2,2	65	54	203
	4	23,8	17,0	3,9	4,8	119	106	154
	5	67,5	50,4	2,2	2,3	37	65	166
	6	53,4	40,6	3,9	4,0	77	70	98
	7	42,7	27,2	7,1	8,3	53	56	184
	8	25,4	19,0	2,0	2,4	264	67	212
Chloralose 25 mg/kg	1	39,3	40,0	5,8	4,2	102	103	387
	2	34,8	30,1	3,5	3,0	191	101	201
	3	26,1	26,0	2,5	2,4	229	161	139
	4	42,7	35,7	7,2	6,1	146	98	195
	5	37,4	30,9	6,1	5,5	115	76	226
	6	24,3	24,3	4,2	4,2	192	71	123
	7	25,2	23,2	4,5	4,5	50	54	246
	8	24,0	21,3	4,6	4,6	100	50	200
Diphenylhydantoin 20 mg/kg	1	30,0	22,1	2,0	0,8	60	37	290
	2	25,2	16,5	1,3	0,9	157	38	209
	3	27,7	23,2	2,7	2,4	242	48	264
	4	32,0	19,7	2,3	0,9	202	37	196
	5	43,4	37,4	1,8	1,5	187	44	325
	6	27,7	26,0	5,8	3,1	231	64	282
	7	27,3	20,7	2,9	1,3	189	77	262
	8	40,0	14,8	1,7	1,3	147	41	255
	9	50,0	37,8	5,3	2,5	210	56	232
	10	33,1	28,4	4,5	3,5	142	45	198
	11	28,9	21,5	3,5	2,5	81	39	182
	12	29,0	21,4	1,2	1,3	87	47	238
	13	32,1	14,0	4,3	3,4	101	54	155
	14	26,9	16,9	5,0	4,6	182	39	320

Tabelle 1. (Fortsetzung)

	Nr.	KSE-Frequenz/min		KSE-Amplitude (mV)		Dauer (sec)		
		Ausg.-W.	Reakt.-W.	Ausg.-W.	Reakt.-W.	Ausg.-W.	Inj.-W.	Reakt.-W.
Luminal-Na 40 mg/kg		32,5	31,2	7,6	6,4	268	127	218
		34,2	21,1	6,5	6,4	340	78	287
		27,2	12,0	7,7	7,7	232	77	300
		41,7	31,0	2,2	2,4	287	52	198
		33,2	23,4	6,1	5,2	280	40	310
		28,5	22,1	3,6	2,5	289	100	260
		23,3	7,2	1,9	1,4	307	93	224
		42,0	36,4	4,6	4,4	224	82	268
		35,2	27,7	4,3	4,3	235	76	273
		24,6	12,8	4,0	2,2	234	75	226
Diphenylhydantoin 10 mg/kg		43,0	37,5	2,2	1,4	307	57	272
		28,7	19,6	8,5	5,9	335	36	304
		30,0	23,6	4,0	3,7	278	37	183
		25,4	23,1	3,9	2,7	191	31	218
		27,7	25,3	8,8	6,2	149	30	197
		20,9	20,0	7,2	6,4	325	43	247
		27,4	25,0	7,2	5,8	355	40	223
		26,1	26,1	8,1	6,4	239	38	152
		23,8	22,0	6,8	5,2	224	35	270
		28,5	25,0	2,3	1,6	327	44	255
		25,4	24,7	5,2	3,8	281	40	209
		36.7	33,1	2,5	2,3	238	40	209

im Wahrscheinlichkeitsnetz ermittelten Kennwerte (C, g_{95} und g_5) für die Verteilung der Ausgangswert- und Reaktionswertkollektive.

Für das *Luminal-Na* kann aus Tab. 2 und Abb. 2 entnommen werden, daß eine Dosis von 20 mg/kg i.v. eine sichere Senkung der KSE-Frequenz/min, dagegen keine Änderung der Spike-Amplitude verursacht. Nach 40 mg/kg Luminal-Na i.v. ist die Senkung der Spike-Frequenz deutlich verstärkt, eine Senkung der Amplitude aber höchstens angedeutet.

Anders verhielt sich das Diphenylhydantoin (Tab. 2 und Abb. 3). Während die Wirkung auf die Frequenz der Spikes in dem gewählten Dosenbereich von 10 und 20 mg/kg die gleiche war wie bei Luminal in der Dosierung von 20—40 mg/kg und auch die gleiche dosenabhängige Abstufung zeigte, ergab das Diphenylhydantoin gleichzeitig schon bei der kleineren Dosierung eine hemmende Wirkung auch auf die Amplitude.

Auch gegenüber Evipan kommt der gleiche Unterschied zum Ausdruck, da dieses bei der gewählten Dosierung in bezug auf den Frequenzeffekt

sogar die höhere Diphenylhydantoindosis noch übertraf, ohne eine Amplitudenwirkung zu zeigen. Auch die Chloralose zeigte mit 25 mg/kg eine zwar geringe, aber deutliche Hemmungswirkung auf die Frequenz ohne Wirkung auf die Amplitude (Tab. 2).

Die hier mitgeteilten Befunde wurden in Versuchen ohne Registrierung des arteriellen Druckes gewonnen. Da mit Blutdrucksenkungen zu rechnen war, wurde in ergänzenden Experimenten Focusaktivität und arterieller Blutdruck (Kondensatormanometer, Kanüle endständig in der A. femoralis) gleichzeitig registriert. Schnelle intravenöse Injektionen von Adenosinmonophosphat und Acetylcholin, die den arteriellen Mitteldruck akut um 30—66% senkten, führten zwar kurzdauernd zu leichten Senkungen der KSE-Frequenz/min, ließen jedoch die Spike-Amplitude völlig unbeeinflußt. Ferner fanden wir, daß auch bei besonders langsamer Injektion von Luminal-Na oder Diphenylhydantoin, die nur leichte und allmähliche Blutdruckänderungen verursachte, dennoch die oben geschilderten Änderungen der KSE-Frequenz je min eintraten. Desgleichen war die Senkung der Spike-Amplitude nach Diphenylhydantion deutlich ausgeprägt. Es ist demnach zwar für die Veränderungen der KSE-Frequenz eine

Tabelle 2. *Im Wahrscheinlichkeitsnetz ermittelte Kennwerte für die Verteilung der Ausgangswert- und Reaktionswertkollektive von KSE-Frequenz/min und KSE-Amplitude*

Substanz	Dosis mg/kg	n	KSE-Frequenz/min						Amplitude (mV)					
			Ausgangswert			Reaktionswert			Ausgangswert			Reaktionswert		
			$C \cdot g_x^{\pm 1}$	g_{95}	g_5	$C \cdot g_x^{\pm 1}$	g_{95}	g_5	$C \cdot g_x^{\pm 1}$	g_{95}	g_5	$C \cdot g_x^{\pm 1}$	g_{95}	g_5
Luminal-Na	20	10	42,0 · 1,93±1	82	21,7	36,0 · 1,70±1 — 14,3%	61	21,2	2,0 · 2,5 ±1	5,9	0,8	wie Ausgangswert		
	40	10	32,85 · 1,49±1	49	22	22,75 · 2,02±1 — 31%	46	11,3	4,45 · 2,38±1	10,6	1,9	4,2 · 2,79±1 ~ — 6%	11,7	1,5
Evipan-Na	25	8	39,5 · 1,77±1	70	22,3	21,0 · 2,60±1 — 46,8%	55	8,1	2,5 · 1,64±1	4,2	1,5	wie Ausgangswert		
Chloralose	25	8	31,0 · 1,74±1	54	18	28,0 · 1,56±1 — 9,8%	43,5	18	4,6 · 1,65±1	7,5	2,8	wie Ausgangswert		
Diphenyl-hydantoin	10	12	27,55 · 1,16±1	33	23,1	24,85 · 1,17±1 — 9,6%	29,2	21,2	6,0 · 2,52±1	15,2	2,4	4,5 · 2,69±1 — 25%	12,1	1,7
	20	14	30,5 · 1,49±1	45,5	20,5	21,5 · 1,63±1 — 29,5%	35	13,2	3,2 · 2,68±1	8,6	1,2	2,45 · 2,74±1 — 23,4%	6,7	0,9

blutdruckbedingte Komponente nicht auszuschließen, andererseits handelt es sich bei der Amplitudensenkung durch Diphenylhydantoin um einen (in den Grenzen unserer Versuchsbedingungen) vom arteriellen Druck unabhängigen Effekt.

Diskussion

Es gelingt also, mit der angewandten Methode einen qualitativen Unterschied zwischen Diphenylhydantoin und Luminal aufzudecken. Bekanntlich hat das Diphenylhydantoin im Gegensatz zum Luminal

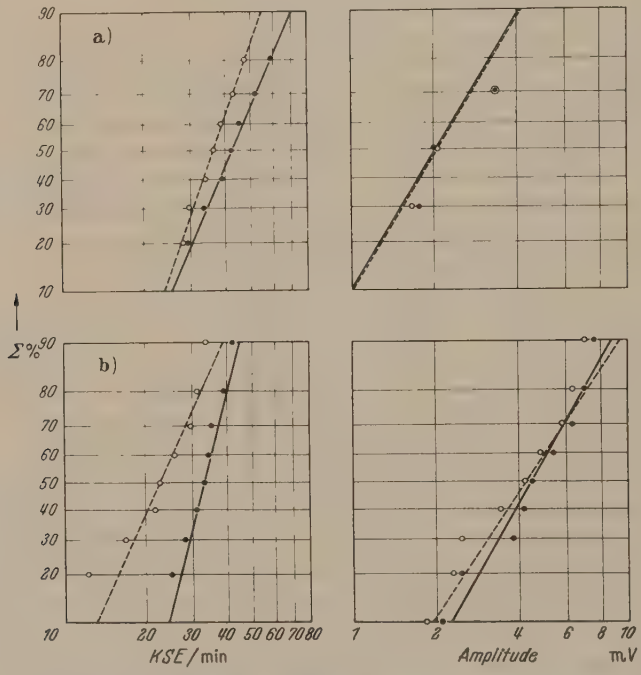


Abb. 2. Wirkung von Luminal auf Frequenz (KSE/min) und Amplitude (mV) der focalen Strychninspikes. *a*) 20 mg/kg; *b*) 40 mg/kg Luminal-Natrium

keine eigentliche hypnotische Wirkung, sondern in höheren Dosen sogar eine erregende[17, 21]. Bei letzterer stehen Speichelfluß, Mydriasis und Atembeschleunigung im Vordergrund, was vielleicht auf einen diencephalen Angriffspunkt hindeutet. Es läßt sich bei dem heutigen Stand unserer Kenntnisse allerdings vorläufig nicht sagen, inwieweit die gefundenen Unterschiede mit jenen zusammenhängen, die bei den gebräuchlichen Testverfahren gefunden worden sind[2, 13, 15, 16, 30]. Daß hier möglicherweise nicht nur Unterschiede im Wirkungsmechanismus, sondern auch in den Angriffspunkten vorliegen, geht vielleicht aus der unterschiedlichen Wirkung beider Stoffe auf Cardiazolkrämpfe hervor.

Auch die potenzierte antikonvulsive Wirkung von kombinierten Luminal- und Diphenylhydantoingaben[3, 31] ist ein Hinweis auf eine Unterschiedlichkeit der Angriffspunkte. Möglichkeiten sind dafür allein schon deshalb vorhanden, weil die Beeinflussung des corticalen Krampffocus sowohl durch eine direkte Wirkung auf die Hirnrinde als auch indirekt vom Hirnstamm aus zustandekommen kann. Die Wechselbeziehungen zwischen Rinde und Hirnstamm, welche reziprok sind, gelten auch für den Strychninfocus[6, 7]. Ferner könnte die Beeinflussung der Spike-

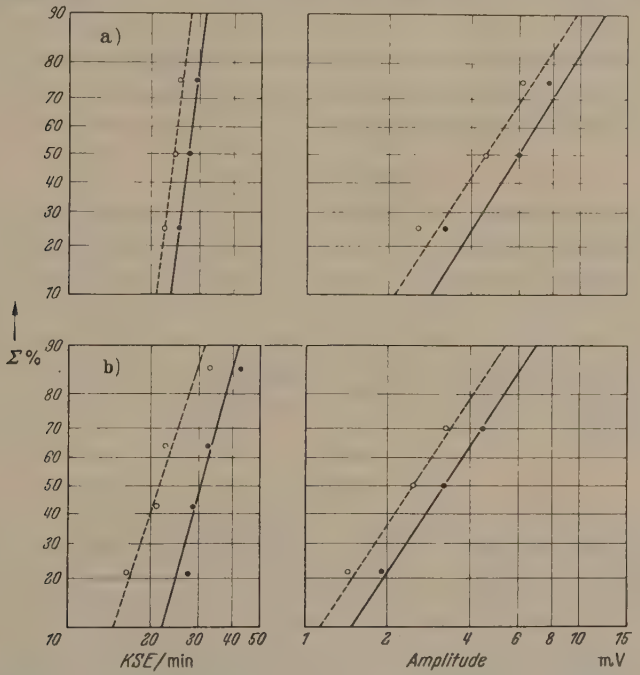


Abb. 3. Wirkung von Diphenylhydantoin auf Frequenz (KSE/min) und Amplitude (mV) der focalen Strychninspikes. a) 10 mg/kg; b) 20 mg/kg Diphenylhydantoin

Frequenz durch Beeinflussung anderer Hirngebiete zustande kommen als die Beeinflussung der Amplitude.

Unabhängig von diesen lokalisatorischen Fragen muß ferner in Betracht gezogen werden, daß in der unterschiedlichen Wirkung auf Frequenz und Amplitude ein verschiedener Einfluß auf Tätigkeit und Zahl der aktiven Neurone zum Ausdruck kommen könnte. Die Hemmung der Amplitude könnte der Ausdruck einer Verminderung der Zahl der tätigen Neurone durch Hemmung synaptischer Übertragung sein und damit vielleicht der wesentliche Faktor für die Hemmung der Erregungsausbreitung, mithin der antikonvulsiven Wirkung sein. Demgegenüber ist

die Hemmung der Frequenz vielleicht die Folge einer Schwellenerhöhung gegenüber der chemischen Reizwirkung des Strychnins im Erregungszentrum.

Da unsere Untersuchungen keine qualitativen Unterschiede zwischen Luminal, Evipan und Chloralose zeigten, so ist das Verfahren offenbar nicht geeignet, grundsätzliche Differenzen zwischen den verschiedenen Barbituraten und ferner zwischen Barbituraten und der Chloralose aufzuzeigen, weder hinsichtlich der antiepileptischen Wirkung noch hinsichtlich ihrer Angriffspunkte. Die Möglichkeit bleibt offen, daß quantitative Unterschiede bestehen, die zum Ausdruck kommen könnten, wenn man die beschriebenen Effekte zu einer anderen Wirkung, z. B. der allgemeinnarkotischen, in Beziehung setzen würde. Hierüber vermögen die bisherigen Versuche nichts auszusagen.

Zusammenfassung

An Katzen in Evipannarkose wurde die elektrische Aktivität eines corticalen Strychninfocus („Strychnin-Spikes") und ihre Veränderungen unter Einwirkung krampfhemmender Substanzen untersucht.

Luminal-Na (20 und 40 mg/kg), Evipan-Na (25 mg/kg), Chloralose (25 mg/kg) und Diphenylhydantoin (10 und 20 mg/kg) bewirkten Abnahme der Spike-Frequenz. Eine gleichzeitige Abnahme der Spike-Amplitude konnte lediglich durch Diphenylhydantoin (10 und 20 mg/kg) erzielt werden.

Literatur

[1] Boller, W.: Schweiz. med. Wschr. **1943**, 699. — [2] Chen, G., and C. R. Ensor: Arch. of Neur. **63**, 56 (1950). — [3] Chen, G., et C. R. Ensor: Arch. internat. Pharmacodynamie **100**, 234 (1954). — [4] Daeves, K., u. A. Beckel: Großzahlforschung u. Häufigskeitsanalyse, Weinheim u. Berlin: Verlag Chemie, 1948. — [5] Driesen, W., F. Hahn u. W. Rummel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 163 (1952). — [6] Dusser de Barenne, J. G., and W. S. McCulloch: J. of Neurophysiol. **1**, 176 (1938). — [7] Dusser de Barenne, J. G., and W. S. McCulloch: J. of Neurophysiol. **1**, 364 (1938). — [8] Everett, G. M., and R. K. Richards: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **81**, 402 (1944). — [9] Fingl, E., L. J. Olsen, B. W. Harding, A. T. Cockett and L. S. Goodman: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **105**, 37 (1952). — [10] Gerlich, N.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 294 (1949). — [11] Gibbs, F. A., E. L. Gibbs and W. G. Lennox: Arch. of Neur. **50**, 111 (1943). — [12] Golla, F., S. Graham and W. G. Walter: J. Ment. Sci. **83**, 137 (1937). — [13] Goodman, L. S., and B. Lih: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **72**, 18 (1941). — [14] Goodman, L. S., J. E. O. Toman and E. A. Swinyard: Amer. J. Med. **1**, 213 (1946). — [15] Goodman, L. S., J. E. P. Toman and E. A. Swinyard: Arch. internat. Pharmacodynamie **78**, 144 (1949). — [16] Goodman, L. S., E. A. Swinyard, W. C. Brown and D. O. Schiffman: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **110**, 403 (1954). — [17] Gruber, C. M., V. G. Haury and M. E. Drake: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **68**, 433 (1940). — [18] Janz, D.: Nervenarzt **21**, 113 (1950). — [19] Jasper, H. H., and J. Kershman: Arch. of Neur. **45**, 903 (1941). — [21] Jung, R.: Med. Klin. **1950**, 257, 289. — [21] Knoefel, P. K., and G. Lehmann: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **76**, 194 (1942). —

[22] Kornmüller, A. E.,: Arch. f. Psychiatr. **114**, 25 (1941). — [23] Kornmüller, A. E., u. W. Noell: Pflügers Arch. **247**, 660 (1944). — [24] Kornmüller, A. E., u. W. Noell: Pflügers Arch. **247**, 713 (1944). — [25] Merrit, H. H., and T. J. Putnam, Arch. of Neur. **39**, 1003 (1938); J. Amer. Med. Assoc. **111**, 1068 (1938). — [26] Noell, W., u. A. E. Kornmüller: Pflügers Arch. **247**, 685 (1944). — [27] Orloff, M. J., H. L. Williams and C. C. Pfeiffer: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **70**, 254 (1949). — [28] Swinyard, E. A., J. E. P. Toman and L. S. Goodman: J. of Neurophysiol. **9**, 47 (1946). — [29] Swinyard, E. A., W. C. Brown and L. S. Goodman: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **106**, 319 (1952). — [30] Toman, J. E. P., and L. S. Goodman: Physiologic. Rev. **28**, 409 (1948). — [31] Weaver, L. C., E. A. Swinyard, L. A. Woodbury and L. S. Goodman: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **113**, 359 (1955). — [32] Weinland, W. L.: Nervenarzt **21**, 119 (1950). — [33] Williams, D.: J. of Neur. **4**, 257 (1941).

Professor Dr. F. Hahn, Düsseldorf, Pharmakol. Institut d. Med. Akademie

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 538—546 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Über die Dopadecarboxylase und Histidindecarboxylase des Nervengewebes*

Von
P. Holtz und E. Westermann

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. Dezember 1955)

Das von Holtz u. Mitarb. in Niere, Leber, Darm und Pankreas nachgewiesene Ferment decarboxyliert die Aminosäure l-3,4-Dioxyphenylalanin *(Dopa)* zu 3.4-Dioxyphenyläthylamin *(Oxytyramin, Dopamin)*. Die physiologische Bedeutung der von ihm katalysierten Reaktion dürfte u. a. darin bestehen, Ausgangsmaterial für die biologische Synthese der Sympathicusstoffe *Nor-adrenalin* und *Adrenalin* bereitzustellen. Diese wirken im Organismus einmal als Hormone des Nebennierenmarks, sodann als Überträgerstoffe sympathischer Nervenerregungen. Der Nachweis der Dopadecarboxylase auch an den Stellen, an denen die Bildung der Sympathicusstoffe erfolgt bzw. an denen sie ihre Funktionen ausüben, wäre deshalb von besonderem Interesse.

Vor einigen Jahren gelang der Nachweis des Fermentes im *Nebennierenmark* von Rindern und Schweinen (Langemann; Holtz u. Bachmann). Wir fanden, daß Markextrakte sich durch an sich unwirksame *Rinden*extrakte bzw. durch einen in der Nebennierenrinde vorhandenen hitzestabilen und dialysablen Stoff ähnlich wie durch *Pyridoxalphosphat* — das Coferment — aktivieren ließen.

Die Sympathicusstoffe — überwiegend Nor-adrenalin — finden sich auch in sympathischen Nerven (v. Euler) und im Gehirn (Holtz). Wir haben untersucht, ob sich in sympathischen *Nerven* und *Ganglien* sowie im *Grenzstrang*, *Rückenmark* und *Gehirn* Dopadecarboxylase nachweisen läßt. Zur Erfassung auch kleiner Fermentmengen dienten Ansätze mit *Pyridoxalphosphat*. Zum Vergleich führten wir Versuche mit Nieren- und Nebennierenextrakten durch sowie mit *Oxy- und Dioxyphenylserinen* als Substrat, da auch diese als Vorstufen der Sympathicusstoffe in Frage kommen und Dioxyphenylserin durch die Decarboxylase der Niere angegriffen werden soll (Blaschko). Gleichzeitig wurde die *Aminoxydase*-aktivität mit *Tyramin* als Substrat bestimmt.

* Siehe kurze Mitteilung P. Holtz u. E. Westermann: Naturwiss. **42**, 647 (1955); **43**, 37 (1956).

Die *Histidindecarboxylase* wurde als von der Dopadecarboxylase verschiedenes, substratspezifisches Ferment in *Niere* und *Leber* (Holtz u. Heise; Werle u. Herrmann), sowie im *Pankreas* und *Darm* nachgewiesen (Holtz u. Credner). *Histamin* kommt auch in Nerven und Gehirn vor (Kwiatowski). Die bei antidromer elektrischer Stimulierung der hinteren Rückenmarkswurzeln bei Hunden auftretende Gefäßerweiterung im segmental entsprechenden Gebiet mit gleichzeitig vermehrter Magensaftsekretion ist auf das Freiwerden von Histamin zurückgeführt worden (Ungar). In Nerven mit hohem *Nor-adrenalin*gehalt soll auch der Histamingehalt besonders hoch sein (v. Euler u. Äström). Wir haben versucht, Histidindecarboxylase auch in Gehirn und Nerven nachzuweisen.

Methodik

Herstellung der Extrakte: Die meisten Versuche wurden mit Extrakten aus Organen frisch *geschächteter* Ochsen gemacht. Gehirn und Rückenmark stammten für den betreffenden Versuch vom gleichen Tier; Grenzstrang, Ganglien (ggl. stellata) und Nerven (Milznerven, Halssympathicus, Vagus, Phrenicus) von 10—20 Tieren. Die Organe wurden auf Eis ins Laboratorium gebracht und nach grober Zerkleinerung mit der Schere im Multimix zu Homogenaten bzw. Phosphatextrakten verarbeitet. Die Extrakte wurden durch Zentrifugieren gewonnen.

1. *Dopadecarboxylase.* Organextrakte wurden mit *l-Dopa* inkubiert und die abgespaltene CO_2 manometrisch in der Warburg-Apparatur gemessen. Die Gefäße enthielten im Hauptraum 2,5 cm³ m/15 Natrium-Phosphatextrakt 1:3, p_H 6,5 bzw. 7,4 + 0,2 cm³ *Pyridoxal*phosphat* (200 γ) bzw. Aqua dest.; im Anhang 0,4 cm³ Aqua dest. (Kontrollansätze) bzw. 0,4 cm³ einer 0,025 m Lösung (etwa 2 mg) von *l-Dopa* bzw. *m-Oxy-(erythro)* oder *3,4-Dioxy-(erythro- bzw. threo) phenylserin*** (Versuchsansätze). — N_2-atmosphäre, 37,5° C.

Am Ende des Versuchs wurden 0.3 cm³ 10%ige H_2SO_4 eingekippt, um die gebundene CO_2 freizusetzen.

2. *Aminoxydase.* Organextrakte wurden mit Tyramin inkubiert und die O_2-Aufnahme manometrisch in der Warburg-Apparatur gemessen. Die Gefäße enthielten im Hauptraum 2,5 cm³ Organextrakt wie oben, p_H 7,4; 0,25 cm³ NaCN m/50; 0,25 cm³ Semicarbazid m/10; — im Einsatz 0,2 cm³ KOH/NaCN; — im Anhang 0,2 cm³ einer 0.2 m Lösung (etwa 7 mg) von Tyraminhydrochlorid. — O_2-atmosphäre, 37,5° C.

Nach eingetretenem Temperaturausgleich wurden die Substratlösungen aus den birnenförmigen Anhängen in den Hauptraum eingekippt. Die Fermentaktivitäten werden in der Tabelle in mm³ O_2 pro 1 g Gewebe und 2 Std ausgedrückt.

3. *Histidindecarboxylase.* Natriumphosphatextrakte (m/15, p_H 7,4) aus Nerven und Gehirn von Rindern (1:3) wurden mit 10 mg Histidin pro Kubikzentimeter unter Zusatz von 100 γ Pyridoxalphosphat pro Kubikzentimeter in N_2-atmosphäre unter Toluol 24 Std bei 37° C inkubiert. Der Histamingehalt wurde am isolierten Meerschweinchendarm getestet (20 cm³ Tyrodebad, Atropin 10^{-7}). Als Kontrollen dienten histidinfreie, sonst gleichbehandelte Extrakte, denen vor der Austestung

* Der Fa. Hoffmann La Roche danken wir für die Überlassung von Versuchsmengen.

** Herrn Prof. Ehrhart, Farbwerke Hoechst, danken wir für die freundliche Überlassung.

die entsprechende Histidinmenge zugesetzt wurde. — Die Histidindecarboxylaseaktivität ist in der Tabelle in γ Histamin ausgedrückt, das — auf 1 g Gewebe bezogen — aus Histidin während der Inkubation zusätzlich gebildet wurde.

Ergebnisse

1. Dopadecarboxylase und Aminoxydase

Die Tab. 1 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse, die in mehreren Einzelversuchen mit jedem der untersuchten Organe erhalten wurden. Es ergibt sich eine charakteristische Verteilung der Fermentaktivität auf die verschiedenen Anteile des Nervensystems.

Die höchste Aktivität besitzen *postganglionäre* sympathische Nerven (Milznerven), sympathische *Ganglien* (ggl. stellata) und *Grenzstrang* (Nr. 1 bis 3). Wesentlich schwächer decarboxylieren *Rückenmark* und *Stammhirn* (Nr. 4 und 5), am schwächsten die *Gehirnrinde* (Nr. 6).

Tabelle 1. *Dopadecarboxylase- und Aminoxydaseaktivität*

Warburg-Apparatur: Die Fermentaktivität ist in mm^3 CO_2 bzw O_2/120 min ausgedrückt und für 1 g Frischgewebe berechnet. Die Ansätze enthielten 2—3 cm^3 Phosphatextrakt + 0,2 cm^3 Pyridoxalphosphat (200 γ) sowie Dopa bzw. Tyramin. Die Leerwerte sind in Abzug gebracht (siehe Methodik)

Nr.	*Rinderorgane* (Phosphatextrakte)	*Dopadecarboxylase* mm^3 CO_2/g/120 min	*Aminoxydase* mm^3 O_2/g/120 min
1	Milznerven	310, 370, 510, 530	445
2	Gangl. stellatum . .	308, 400	270
3	Grenzstrang . . .	265, 290	257
4	Rückenmark . . .	85, 108, 110, 117, 138, 180	130, 164
4a	Medulla oblongata .	106, 118, 126	
5	Stammhirn	60, 66, 95, 104, 105, 117, 128, 138	440, 500, 575
5a	Hypothalamus . . .	130, 175	
5b	Thalamus	68, 120	
5c	Nucl. caudatus . .	111, 120, 174	
6	Gehirnrinde	5, 12, 28, 29, 38	240, 285
7	Halssympathicus . .	16, 32	45, 34
8	Halsvagus	4, 8, 11	14
9	N. Phrenicus . . .	0	0

Extrakte aus dem *präganglionären* Halssympathicus (Nr. 7), der mit dem Vagus in gemeinsamer Scheide verläuft, sind mindestens 10fach schwächer wirksam als Extrakte aus den rein *post*ganglionären Milznerven. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß der Halssympathicus auch postganglionäre Fasern beigemischt enthält, die z. B. aus dem ggl. stellatum stammen. Die — noch geringere — Wirksamkeit von

Halsvagusextrakten (Nr. 8) dürfte auf einer Beimischung sympathischer Fasern beruhen, deren vollkommene Abtrennung kaum möglich ist. *Phrenicus*extrakte sind unwirksam (Nr. 9).

Bei einem Vergleich der ebenfalls in der Tab. 1 wiedergegebenen Werte für die *Aminoxydase-* mit denjenigen der *Dopadecarboxylase*aktivität ergibt sich eine gewisse Proportionalität in den einzelnen Abschnitten des Nervensystems. Nur das Gehirn enthält unverhältnismäßig viel Aminoxydase.

Auffällig ist die starke *Aktivierbarkeit* der Dopadecarboxylierung durch *Pyridoxalphosphat*. Die Abb. 1 zeigt gleichzeitig, daß in den mit Dopa inkubierten Extrakten der Abspaltung von CO_2 die Entstehung einer pressorisch wirksamen Substanz entspricht. In *Gehirn*extrakten wäre der Nachweis des Fermentes ohne Zusatz des Cofermentes überhaupt nicht möglich gewesen. Das wird besonders deutlich bei einem Vergleich mit dem Verhalten der *Oxy- und Dioxyphenylserine*.

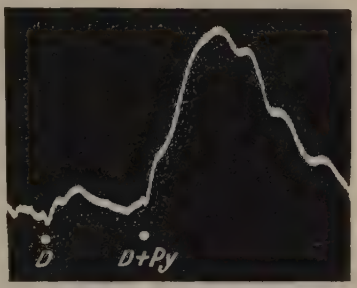


Abb. 1. *Aktivierung der Dopadecarboxylase durch Pyridoxalphosphat.* Katze 1,8 kg. Pernoctonnarkose. 4 mg Hibernon (p-Brombenzyl-α-pyridyl-dimethylaminoäthylaminhydrochlorid) als Antihistaminicum. Atropin sulf. 1 mg/kg. Injektion von 0,2 cm³ eines enteiweißten Inkubates (60 min bei 37° C in N_2) von D: Milznervenextrakt + Dopa (2 mg); D + Py: Milznervenextrakt + Dopa (2 mg) + Pyridoxalphosphat (200 γ)

2. *Decarboxylierung von Oxy- und Dioxyphenylserinen*

Die Phenylserine werden durch Nerven-, Gehirn- und Rückenmarksextrakte unvergleichlich schwächer und langsamer decarboxyliert als Dopa. Bemerkenswert ist, daß — im weiteren Gegensatz zu Dopa — ihre Decarboxylierung durch Pyridoxalphosphat nur wenig aktiviert wird (Tab. 2, Nr. 1—4).

Die in der Tab. 2 aufgeführten Beispiele entsprechen Versuchen, in denen die 4 verschiedenen Substrate gleichzeitig mit je 2,5 cm³ des gleichen Extraktes inkubiert wurden. Aus einem in der Abb. 2 kurvenmäßig dargestellten Versuch mit Milznervenextrakt ist die verschiedene *Geschwindigkeit* der Decarboxylierung von Dopa und Oxyphenylserin zu ersehen.

Auch Nierenextrakte decarboxylieren Dopa viel stärker und schneller als die Phenylserine (Tab. 2, Nr. 5 und 6), und auch hier aktiviert Pyridoxalphosphat kaum.

Das gleiche trifft für *Nebennierenextrakte* zu: *Schweine*nebenniere decarboxyliert, wie wir schon vor mehreren Jahren gefunden hatten (Holtz u. Bachmann), *Dopa* sehr gut; die Phenylserine werden auch bei Zusatz von Pyridoxalphosphat fast überhaupt nicht angegriffen (Tab. 2, Nr. 11

Tabelle 2. *Decarboxylierung von Dopa und Oxy- bzw. Dioxyphenylserinen* Warburg-Apparatur: Ansätze = 2,5 cm³ Organextrakt; 0,4 cm³ Substrat (0,025 mol); 0,2 cm³ Pyridoxalphosphat (Py), 200 γ. Die Leerwerte sind in Abzug gebracht

Nr.	Organe (Phosphatextrakte)	pH	mm³ CO_2/60 min							
			Dopa		[*l*]-*m*-*Oxyph. S.*		[*e*] *Dioxyph. S.*		[*th*] *Dioxyph. S.*	
			—	Py	—	Py	—	Py	—	Py
1	Milznerven (Rind) 1:5 .	6,5	16	98	4	8	0	4	0	2
2	„ „ 1:2 .	7,4	21	128	19	23	12	17	0	0
3	Gehirn (Rind) 1:2 . .	7,4	0	26	1	4	0	3	0	0
4	Rückenmark (Rind) 1:2	7,4	6	30	3	4	3	5	0	0
5	Niere (Schwein) 1:3 . .	7,4	102		26		27		10	
6	„ „ 1:3 . .	6,5	146		27		33		7	
6a	„ „ 1:20 .	6,5	21	123	6	8				
7	Nebennierenmark (Rind) 1:2	7,4	36	128	25	35	24	32	6	8
8	Nebennieren (Rind) 1:3	6,5	14	98		9		11		
9	„ „ 1:3	6,5		162		11		10		0
10	„ „ 1:3	6,5		167		24		29		15
11	Nebennieren (Schwein) 1:3	6,5		159		7		1		1
12	Nebennieren (Schwein) 1:3	7,4		132		0		0		0

und 12). In Versuchen mit *Rinder*nebenniere läßt sich die Dopadecarboxylierung durch Pyridoxalphosphat auf das 4—6fache steigern, die der Phenylserine hingegen kaum nennenswert (Tab. 2, Nr. 7—10)*.

3. Histidindecarboxylase

Aus der Tab. 3 ist zu erkennen, daß *Milznerven* und *ggl. stellatum*, deren *Dopa*decarboxylaseaktivität besonders hoch ist, auch *Histidin* besonders gut decarboxylieren. Die Aktivität beider Fermente sinkt dann in *Rückenmark*, *Stammhirn* und *Gehirnrinde* stark ab. Andererseits findet sich in *Vagus* und *Phrenicus*, die praktisch frei von Dopadecarboxylase und Nor-adrenalin sind, aber Histamin enthalten, eine höhere Histidindecarboxylaseaktivität, die allerdings bei weitem nicht an diejenige der nor-adrenalinreichen — und histaminhaltigen — postganglionären

* Werle, E. (Naturwiss. 42, 371 (1955) fand demgegenüber mit Pyridoxalphosphat im Rindernebennierenmark eine Aktivitätssteigerung der „Serindecarboxylase" auf etwa das Dreifache.

sympathischen Nerven (Milznerven) und der Ganglien (ggl. stellata) heranreicht.

Die Abb. 3 gibt ein Beispiel für die Austestung eines mit Histidin inkubierten Milznervenextraktes und eines Kontrollansatzes.

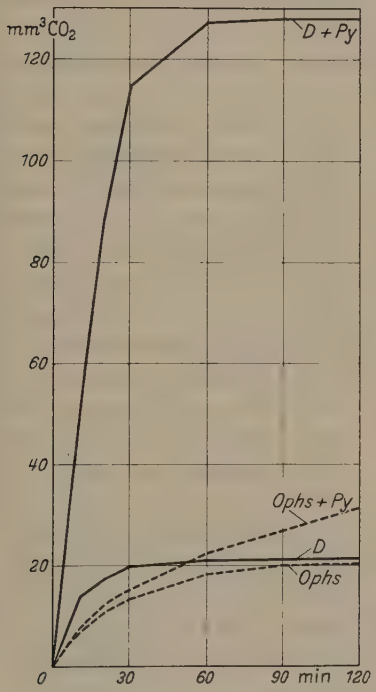


Abb. 2

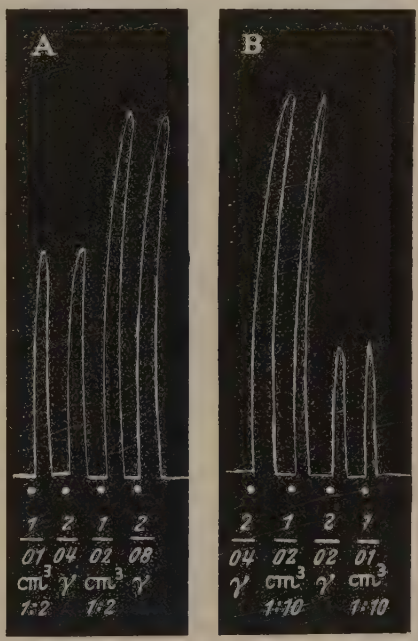


Abb. 3

Abb. 2. *Zeitlicher Verlauf der Decarboxylierung von Dopa und Oxyphenylserin.* WARBURG-*Apparatur*: manometrische Messung der abgespaltenen CO_2. Versuchsanordnung siehe Methodik. *Versuchsansatz*: 1. 2,5 cm³ Milznervenextrakt 1:3 (p_H 6,5); 2. je 0,4 cm³ (0,025 mol) Substratlösung: D = Dopa; Ophs = m-Oxy(erythro)phenylserin. Py = 200 γ Pyridoxalphosphat

Abb. 3. *Histidindecarboxylase.* Austestung folgender Inkubate (24 Std bei 37° C in N_2) am atropinisierten Meerschweinchenileum (siehe Methodik). A: 5 cm³ Milznervenextrakt (Rind) 1:3, p_H 7,4. 0,05 cm³ Pyridoxalphosphat (500 γ). Vor der Austestung Zusatz von 1 cm³ Histidin (50 mg). Ergebnis: 0,2 cm³ (1:2) = 0,8 γ Histamin; 1 cm³ Originalansatz = 8 γ Histamin. 1: Extrakt; 2: Histamin B: wie A, jedoch mit 50 mg Histidin inkubiert. Ergebnis: 0,2 cm³ (1:10) = 0,4 γ Histamin; 1 cm³ Originalansatz 20 γ Histamin. 1: Inkubat; 2: Histamin

Bemerkungen

1. Das wesentliche Ergebnis der vorliegenden Arbeit scheint uns zu sein: 1. daß die *Dopadecarboxylase* — das Ferment, dessen physiologische Aufgabe in der Bereitstellung von Muttersubstanz für die Biosynthese der Sympathicusstoffe besteht — nicht nur in den großen parenchymatösen Organen vorkommt, sondern auch da, wo die Sympathicusstoffe ihre wichtigste Funktion ausüben, — im sympathischen Nervensystem; 2. daß die Dopadecarboxylase*aktivität* der verschiedenen Anteile des

sympathischen Systems ihrem Nor-adrenalin (Arterenol)-gehalt parallel geht, dessen Kenntnis wir den Untersuchungen U. S. v. Eulers verdanken, indem z. B. die nor-adrenalin*reichen* sympathischen *Ganglien* und die *postganglionären* — „arterenergischen" — Nervenstrecken auch eine besonders hohe Fermentaktivität besitzen, während sich in den nor-adrenalin*armen* präganglionären — „cholinergischen" — Nervenstrecken ähnlich wie in Vagus und Phrenicus nur eine kaum nachweisbare Decarboxylaseaktivität findet. Auch im Gehirn scheint die von M. Vogt näher untersuchte Topographie der Nor-adrenalinverteilung mit derjenigen der Dopadecarboxylase übereinzustimmen, indem wir in den relativ nor-adrenalinreichen Kernregionen des Stammhirns auch eine hohe Dopadecarboxylaseaktivität finden, während die Hirnrinde praktisch unwirksam ist. Diese Befunde machen die Annahme vielleicht unnötig, daß den Ganglien und postganglionären Neuronen des sympathischen Nervensystems die für die Bildung der Überträgerstoffe erforderliche Muttersubstanz — Oxytyramin (Dopamin) — auf dem Blutwege zugeführt werden müsse, da alle Bedingungen für ihre Entstehung an Ort und Stelle gegeben sind.

Tabelle 3. *Histidindecarboxylase*
Die Fermentaktivität ist in γ Histamin ausgedrückt, das zusätzlich während der Inkubation aus zugesetztem Histidin gebildet wurde (siehe Methodik)

Nr.	Rinderorgane (Phosphatextrakte)	Histaminbildung γ/g
1	Milznerven	68
2	Ggl. stellatum	46
3	N. Phrenicus	16
4	N. Vagus	11
5	Rückenmark	7
6	Stammhirn	5
7	Gehirnrinde	1

In diesem Zusammenhang verdient die außerordentlich starke Aktivierbarkeit der Dopadecarboxylase des Nervengewebes durch Pyridoxalphosphat oder — anders ausgedrückt — das im Nervensystem anscheinend bestehende mengenmäßige Mißverhältnis zwischen Apo- und Coferment besonderes Interesse. Die Erfahrung, daß selbst in konzentrierten Gehirnhomogenaten ohne Zusatz von Pyridoxalphosphat der Nachweis der Dopadecarboxylase nicht möglich gewesen wäre, läßt die Annahme nicht abwegig erscheinen, daß im Nervensystem tatsächlich ein relativer — *physiologischer* — Mangel an Coferment besteht, unbeschadet der Tatsache, daß die Dopadecarboxylase ein besonders stark dissoziierendes Proteid ist. Daraus ließe sich dann vielleicht weiter folgern, daß das Coferment bzw. seine Muttersubstanz *Pyridoxin* oder *Vitamin* B_6 — in ganz *besonderem* Maße „limiting factor" der Fermentaktivität — ein Regulator für die Bildung der Überträgerstoffe der Nervenwirkung und damit für den Aktivitätszustand des sympathischen Nervensystems von Bedeutung ist.

2. In früheren Untersuchungen über die *Spezifität* der Aminosäurendecarboxylasen fanden wir, daß *Tyrosin* (p-Oxyphenylalanin) kein Substrat der tierischen Dopadecarboxylase ist (Holtz, Credner u. Walter). Dieser Befund wurde von Blaschko u. Mitarb. bestätigt und dahin erweitert, daß nur solche Phenylalanine durch Dopadecarboxylase angreifbar sind, die eine phenolische OH-Gruppe entweder in der *Ortho-* oder *Meta*stellung besitzen. So wurden — wenn auch bei weitem nicht so gut wie Dopa (l-3,4-Dioxyphenylalanin) — o- und m-Tyrosin, ferner l-3,5-Dioxyphenylalanin vom Ferment decarboxyliert. Es ist deshalb verständlich, daß Phenyl*serine* mit einer m-OH-Gruppe bei der Inkubation mit dopadecarboxylasehaltigen Organextrakten CO_2 abspalten, wie das die untersuchten Oxy- und Dioxyphenylserine tun. Ihre Affinität zum Ferment ist aber größenordnungsmäßig von derjenigen des Dopa verschieden: die Decarboxylierung erfolgt weit langsamer und ist durch Pyridoxalphosphat — das Coferment — viel weniger aktivierbar als die Dopadecarboxylierung. *Threo*-3,4-Dioxyphenylserin wurde am schlechtesten decarboxyliert. Das ist deshalb besonders bemerkenswert, weil gerade dieses Phenylserin durch CO_2-abspaltung direkt in *l*-Noradrenalin übergehen würde.

Wir konnten ferner in früheren Untersuchungen zeigen, daß die Affinität eines Fermentes zu einem bestimmten Substrat organ- und artspezifische Unterschiede aufweist, indem z. B. die Mono-aminoxydase der Katzenleber oder -niere andere Amine *bevorzugt* abbaut als das Ferment der entsprechenden Meerschweinchenorgane (Holtz u. Büchsel). Wenn deshalb die Phenylserine durch Extrakte aus *Schweine*nebennieren, die eine hohe *Dopadecarboxylase*aktivität besitzen, praktisch nicht angegriffen werden, wohl aber durch *Rinder*nebennierenextrakte, so braucht das nicht notwendig für die Existenz einer von der Dopadecarboxylase verschiedenen „Serindecarboxylase" zu sprechen, wäre vielmehr mit der Vorstellung vereinbar, daß auch die Serine Substrate der Dopadecarboxylase sind, daß nur die Decarboxylierungsgeschwindigkeit eine geringere ist.

Wenn somit auch die im Vergleich mit Dopa weitaus geringere Affinität der Oxy- und Dioxyphenylserine zum Ferment, ferner die Tatsache, daß im Gegensatz zu Dopa ihr Vorkommen im Tierkörper unseres Wissens bisher nicht erwiesen ist, dafür spricht, daß nicht sie, sondern *Dopa* die Muttersubstanz der Sympathicusstoffe im Nervensystem ist, so wäre doch für die endgültige Beweisführung der *Nachweis von Oxytyramin* im dopadecarboxylasehaltigen Nervengewebe erforderlich. Dieser Nachweis wird in einer folgenden Arbeit von H. J. Schümann erbracht.

Summary

1. In extracts of different parts of the nervous system the activity of *l(-)dopa decarboxylase* is determined manometrically by measuring the formation of carbon dioxide in nitrogen-atmosphere. Highest activity is found in extracts of *postganglionic* sympathetic nerves (splenic nerves), sympathetic *ganglia* (ggl. stellatum) and the *sympathetic trunk*; lower

activity in extracts of the *spinal cord* and *brain stem*; lowest activity —nearly none—in *cerebral cortex*. Extracts of *praeganglionic* sympathetic nerves and of the *Vagus* have very low, the *phrenic* nerve none activity.

2. Addition of *pyridoxalphosphate*—the codecarboxylase—raises the activity of the extracts four to five fold. In brain extracts only by addition of pyridoxalphophate dopa decarboxylase activity is detectable.

3. *m-Hydroxy-* and *Dihydroxyphenylserine* were only very little decarboxylated. Pyridoxalphosphate scarcely activated.

4. The activity of *histidine-decarboxylase* was determined by incubating the extracts with l-histidine and testing the histamine content of the incubated extracts on the isolated guinea-pig ileum. Highest activity was found in *splenic nerves* and in the *ggl. stellatum*, lower activity in the *phrenic* and *vagal* nerve, lowest in the *spinal cord*, *brain-stem* and *cerebral cortex*.

5. The results strongly indicate, that the formation of *hydroxytyramine* by l (-) dopa decarboxylase not only represents an intermediary step in the *nor-adrenaline synthesis*, but that this synthesis can be performed by the nervous tissue itself.

Literatur

Blaschko, H.: Brit. J. Pharmacol. **3**, 315 (1948); **5**, 431 (1950). — Blaschko, H. u. Mitarb.: J. of Physiol. **101**, 337 (1942); **108**, 427 (1949); **110**, 482 (1950). — Euler, U. S. v.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **13**, 1 (1946). — J. of Physiol. **105**, 26, 38 (1946). — Euler, U. S. v., u. A. Äström: Acta physiol. scand. (Stockh.) **16**, 97 (1948). — Holtz, P. u. Mitarb.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **191**, 87 (1938); **199**, 145 (1942); **200**, 356 (1942). — Erg. Physiol. **44**, 230 (1941). — Holtz, P., u. F. Bachmann: Naturwissenschaften **39**, 116, 235 (1952). — Holtz, P.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **20**, 354 (1950). — Holtz, P., u. R. Heise: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **186**, 377 (1937). — Naturwissenschaften **1937**, 201. — Klin. Wschr. **1937**, 1561. — Holtz, P., u. K. Credner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **193**, 688 (1939). — Holtz, P., K. Credner u. H. Walter: Z. physiol. Chem. **262**, 111 (1939). — Holtz, P., u. H. Büchsel: Z. physiol. Chem. **272**, 201 (1942). — Kwiatowski, H.: J. of Physiol. **102**, 32 (1943). — Langemann, H.: Brit. J. Pharmacol. **6**, 318 (1951). — Schümann, H. J.: Naturwissenschaften **43**, 37 (1956). — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 566 (1956). — Ungar, G.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **118**, 620 (1935). — Vogt, M.: J. of Physiol. **123**, 451 (1954). — Werle, E., u. H. Herrmann: Biochem. Z. **291**, 105 (1937).

Prof. Dr. P. Holtz, Frankfurt/M., Ludwig-Rehn-Str. 14, Pharmakol. Institut der Universität

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 547—558 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Beeinflussung der Wirkung biogener Amine durch Hemmung der Aminoxydase

Von
H. Balzer und P. Holtz

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. Dezember 1955)

Die *Monoaminoxydase* ist wohl auch *in vivo* das wichtigste Ferment für den Abbau aliphatischer Monoamine und der einfachen Phenyl- und Indolylalkylamine. Demgegenüber kommen für die Inaktivierung der vom *Brenzkatechin* sich ableitenden Sympathicusstoffe Nor-adrenalin und Adrenalin sowie für ihnen nahestehende Verbindungen z. B. Oxytyramin neben der oxydativen Desaminierung durch die Aminoxydase die Paarung mit Schwefelsäure oder Glucuronsäure und die Oxydation der ringständigen OH-Gruppen in Frage. Es wäre deshalb verständlich, wenn eine Hemmung der Aminoxydase sich auf die Wirkung der verschiedenen Amine verschieden auswirken würde.

In vitro wird die Aminoxydase der Leber und des Gehirns durch Marsilid („Isoproniacid") gehemmt (Zeller u. a.), Methylenblau soll die gleiche Wirkung haben (Philpot). Auch nach *subcutaner* Injektion von Marsilid war bei Ratten und Meerschweinchen die Aminoxydaseaktivität von Gehirn- und Lebermitochondrien stark reduziert (Zeller u. Barsky). Dem entsprechen die Versuchsergebnisse von Schayer an Mäusen und Ratten mit C^{14} — in der α-Stellung markiertem Tyramin, daß Vorbehandlung der Tiere mit Marsilid die Ausscheidung unveränderten Tyramins im Harn merklich erhöht. Andererseits schließen v. Auler u. Zetterström aus Versuchen am Menschen mit subcutaner Verabfolgung von *Adrenalin*, das *in vitro* von der Aminoxydase abgebaut wird, und *Corbasil* (o-Dioxy-phenyl-propanolamin), das von dem Ferment nicht angegriffen wird, daß für die Inaktivierung des Adrenalins *in vivo* der Aminoxydase keine Bedeutung zukomme, da die Ausscheidungsquote beider Amine durch Marsilid in gleicher Weise unbeeinflußt blieb.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Beobachtung anderer Autoren (Griesemer, Barsky u. a.), daß zwar die Wirkung des *Phenyläthylamins* und *Tyramins*, nicht aber diejenige des Adrenalins an der Nickhaut der Katze durch Marsilid potenziert wird, wobei ungeklärt bleibt, weshalb der Potenzierung der *Nickhaut*wirkung nicht eine solche der *blutdrucksteigernden* Wirkung entspricht. In Versuchen von West an Katzen mit *Methylenblau* als Hemmstoff für die Aminoxydase kam es zu einer Verstärkung auch der Adrenalin- und Nor-adrenalinwirkung — und zwar sowohl an der Nickhaut als auch am Blutdruck —, jedoch nur bei *intraportaler* Injektion der Pharmaka. Schließlich schreiben Griesemer, Dragstedt u. a. dem Marsilid neben einer inhibitorischen Wirkung auf die Aminoxydase auch eine

sympathicolytische Wirkung zu, da es die Kontraktion des Furchgottschen Kaninchenaortapräparates auf Adrenalin hemmt oder aufhebt.

Neben den aus der kurzen Literaturübersicht hervorgehenden Diskrepanzen gaben die Untersuchungen Burns über das Vorkommen der Aminoxydase nicht nur in den großen parenchymatösen Organen — Leber, Niere —, sondern auch in der Nickhaut und in den Gefäßwänden, d. h. an Stellen, an denen die *Sympathicusstoffe* ihre Funktion als Überträgerstoffe ausüben, und an denen deshalb dem *Ferment* eine ähnliche Bedeutung zukommen könnte wie der Acetylcholinesterase an den parasympathischen Nervenenden, Veranlassung zu unseren im folgenden mitgeteilten Versuchen.

Versuche

Wir untersuchten an *Katzen* den Einfluß von Marsilid und Methylenblau auf die Blutdruck- und Nickhautwirkung des Adrenalins und Noradrenalins, des Tyramins und Oxytyramins sowie des Tryptamins und Oxytryptamins (Serotonins), ferner die Beeiflnussung der Blutdruckwirkung intravenös injizierten Dioxyphenylalanins (Dopa); an *Meerschweinchen* die Beeinflussung der Ausscheidungsquote des Oxytyramins, das nach intramuskulärer Injektion von Dopa im Harn ausgeschieden wird

Methodik

1. Die Versuche an *Katzen* wurden entweder in Pernoctonnarkose (0,7 cm^3/kg der 10%igen Lösung ad usum veterinarium) oder am Spinaltier gemacht. Blutdruckregistrierung mit Hg-Manometer in der Art. femoralis; Injektionen in die V. femoralis. Zur Verhinderung der Blutgerinnung erhielten die Tiere 10 mg/kg Polyäthylensulfosaures Natrium (Farbwerke Hoechst).

2. In den Diureseversuchen mit *Meerschweinchen* wurde 3—500 g schweren männlichen Tieren, die seit 12—16 Std ohne Nahrung waren, 5 cm^3/100 g Aqua dest. peroral verabfolgt, anschließend die betreffenden Substanzen in 0,9%iger NaCl-Lösung i.m. Die Tiere saßen einzeln in Diuresekäfigen. — Der 4 Stundenharn wurde mit HCl auf p_H 3 gebracht und 20 min im siedenden Wasserbad hydrolysiert. Zur Adsorption der Brenzkatechinderivate wurden 2—3 cm 10%iges Aluminiumsulfat zugesetzt, das p_H mit n/10 NaOH auf 7,5—8,0 gebracht, das abzentrifugierte Aluminiumhydroxyd nach mehrfachem Auswaschen in 2 n H_2SO_4 gelöst (v. Euler). Durch Zusatz des 5fachen Volumens eines Alkohol-Aceton-Gemisches wurde das Aluminium im Eisschrank ausgefällt, die überstehende Lösung im Vakuum eingedampft, mit Aqua dest. auf 10 cm^3 aufgefüllt und nach Neutralisation mit NaOH am Katzenblutdruck ausgetestet.

Adrenalin und Nor-adrenalin

Die Injektion von 40 mg/kg *Marsilid* verursacht meistens eine 5 bis 10 min anhaltende Blutdruck*steigerung*, an die sich ein 1—1½ Std dauerndes *Absinken* des Blutdrucks unter die Ausgangshöhe anschließt. Injiziert man in dieser Phase die vorher verabfolgte Testdosis Noradrenalin bzw. Adrenalin, so ist deren Wirkung an der Nickhaut deutlich

abgeschwächt (Abb. 1 *A* und *B*). 2 Std nach Marsilid hat der Blutdruck sein Ausgangsniveau wieder erreicht. Die Nor-adrenalin- und Adrenalinwirkung auf den Blutdruck ist jetzt regelmäßig etwas verstärkt, die Wirkung auf die Nickhaut hingegen hat lediglich wieder ihre anfängliche

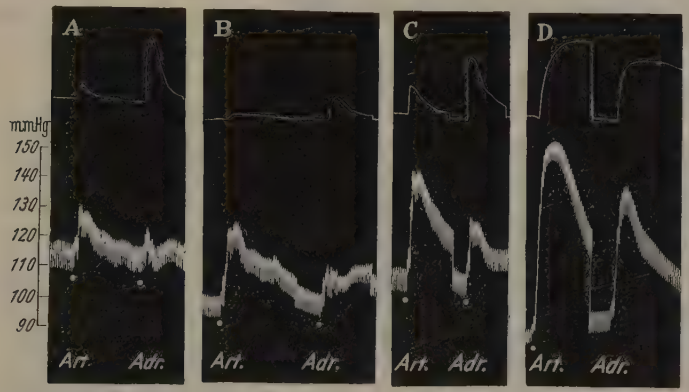


Abb. 1. *Adrenalin — Nor-adrenalin.* Primäre Abschwächung der Nickhautwirkung, Verstärkung der Blutdruckwirkung durch Marsilid (siehe Text). Oben Nickhaut. — Unten: Blutdruck. *Katze* 3,9 kg. Pernoctonnarkose. Künstliche Atmung. *Art.* 5 γ l-Arterenol hydrochlorid (Nor-adrenalin); *Adr.* 5 γ l Suprarenin. hydrochlorid (Adrenalin). *A*: vor Marsilid. *B*: 60 min nach Marsilid (40 mg/kg i.v.). *C*: 120 min nach Marsilid. *D* 15 min nach Cocain hydrochl. 5 mg/kg i.v.

Abb. 2. *Tyramin — Oxytyramin. Katze* 3,0 kg. Pernoctonnarkose. Künstliche Atmung. *Tyr.* 500 γ Tyramin; *Oxytyr.* 400 γ Oxytyramin. *A* vor Marsilid. *B* 60 min nach Marsilid (40 mg/kg i. v.). *C* 150 min nach Marsilid. *D* 10 min nach 5 mg/kg i.v. Cocain hydrochl.

Stärke erreicht, ohne jemals verstärkt zu sein (Abb. 1 *C*). *Cocain* führt anschließend zu einer sehr deutlichen Potenzierung sowohl der Blutdruck- als der Nickhautwirkung beider Sympathicusstoffe (Abb. 1 *D*). Im Gegensatz zu Marsilid kommt es nach *Methylenblau* (20 mg/kg) eher zu einer Potenzierung der *Nickhaut*wirkung als der *Blutdruck*wirkung. Sie tritt schon nach 10—15 min auf, und es geht ihr keine Abschwächung voraus.

Tyramin und Oxytyramin

Die Wirkungen des *Oxytyramins* werden durch Marsilid ähnlich wie diejenigen des Nor-adrenalins und Adrenalins beeinflußt. Die *Nickhaut*kontraktion scheint zuerst etwas abgeschwächt zu sein (Abb. 2 *B*) und ist auch nach 2—3 Std nicht verstärkt (Abb. 2 *C*). Die *pressorische* Wirkung ist nach Marsilid etwas stärker als vorher.

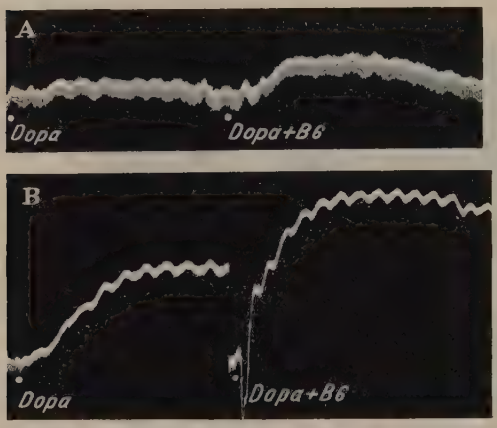


Abb. 3. *Verstärkung der pressorischen Dopawirkung durch B_6 und Marsilid. Spinalkatze* 2,7 kg. Dopa 2 mg l-Dopa i.v. Dopa + B_6 2 mg l-Dopa + 10 mg/kg B_6 (Pyridoxin). *A* vor Marsilid. *B* 30 min nach Marsilid (40 mg/kg)

Anders verhält sich *Tyramin*. Blutdruck- und Nickhautwirkung werden durch Marsilid sehr verstärkt. Für diesen Marsilideffekt ist an der Nickhaut eine „Latenz" von 1—2 Std charakteristisch, die der primären Abschwächung der Nor-adrenalin- und Adrenalinwirkung entspricht (Abb. 2 *A*—*C*). Anschließend werden die *Tyramin*wirkungen durch *Cocain* abgeschwächt, die *Oxytyramin*wirkungen verstärkt (Abb. 2 *D*).

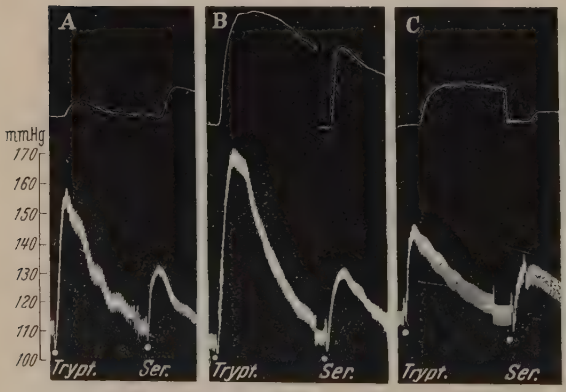


Abb. 4. *Tryptamin — Oxytryptamin.* Katze 2,3 kg. Pernoctonnarkose. Künstliche Atmung. *Trypt.* 1 mg Tryptamin i.v. *Ser.* 200 γ Oxytryptamin (Serotonin). *A* vor Marsilid. *B* 120 min nach Marsilid. (40 mg/kg i.v.). *C* 15 min nach Cocain (5 mg/kg i.v.)

Dopa

Die i.v. Injektion von 5—10 mg/kg Dopa verursacht an der Katze durch intermediär entstehendes Oxytyramin (Dopamin) protrahiert verlaufende Blutdrucksteigerungen (Holtz u. Credner). In früheren Versuchen mit Nebennierenmarkextrakten konnten wir zeigen, daß Vitamin B_6 (Pyridoxin) vermutlich unter Oxydation zu Pyridoxal — dem Coferment — die Dopadecarboxylase aktiviert (Holtz u. Bachmann.)

Im Versuch der Abb. 3 *A* hat die kleine Dosis von 2 mg Dopa nur eine ganz schwache pressorische Wirkung. Bei gleichzeitiger Injektion von

10 mg/kg B_6 wird diese deutlicher und erfährt durch Blockade der Aminoxydase mit Marsilid eine gewaltige Verstärkung (Abb. 3 *B*).

Tryptamin und Oxytryptamin (Serotonin)

Die primär abschwächende Wirkung des Marsilids auf die *Nickhaut*effekte der bisher untersuchten Amine tritt in den Versuchen mit *Tryptamin* und *Oxytryptamin* (Serotonin) besonders deutlich in Erscheinung. An die 1—1½ Std dauernde Primärphase der Abschwächung schließt sich eine Sekundärphase der Verstärkung an (Abb. 4). — Die *Blutdruck*wirkung ist

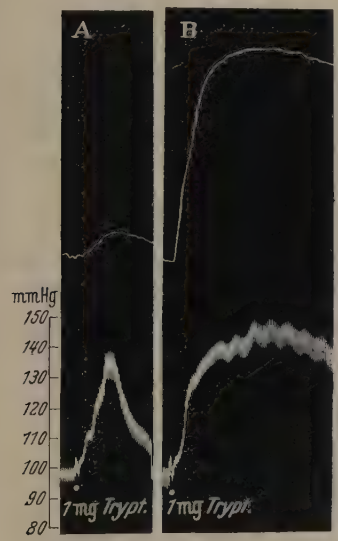


Abb. 5. *Verstärkung der Tryptaminwirkung durch Methylenblau. Katze* 2,0 kg. Pernoctonnarkose. Künstliche Atmung. *A* vor Methylenblau. *B* 15 min nach Methylenblau (20 mg/kg i.v.)

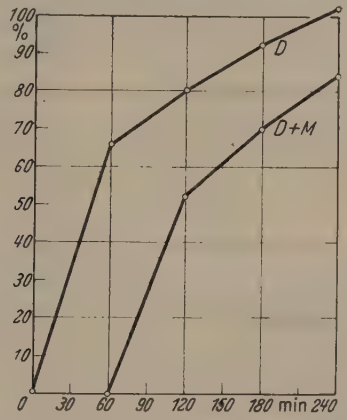


Abb. 6. *Diuresehemmung durch Dopa + Marsilid. Meerschweinchen* 400 und 410 g. Diureseversuch (siehe Methodik). *D* 20 mg/kg l-Dopa i.m. *D + M*: 20 mg/kg l-Dopa + 40 mg/kg Marsilid i.m. Ordinate: Harnmengen in Prozent der verabfolgten Wassermengen

von Anfang an beim *Tryptamin* deutlich verstärkt, beim Serotonin nicht eindeutig verändert. — *Cocain* schwächt ähnlich wie die Wirkungen des Tyramins auch diejenigen des Tryptamins und Serotonins ab.

Methylenblau führt zu einer geradezu enormen Potenzierung der Tryptamineffekte, ohne daß dieser eine Phase der Abschwächung vorausginge (Abb. 5).

Oxytyraminausscheidung nach Dopainjektion

Bei Meerschweinchen erscheint nach i.m. Injektion von Dopa blutdrucksteigerndes Oxytyramin im Harn (Holtz u. Credner). Oxytyramin verursacht eine Diuresehemmung (Holtz, Credner u. Heepe).

Die Abb. 6 gibt ein Beispiel für 3 gleichartig verlaufene Versuche an je 2 gleichschweren Meerschweinchen, von denen nach oraler

Verabfolgung von 5 cm⁴/100 g Aqua dest. dem einen 20 mg/kg Dopa, dem anderen außerdem 40 mg/kg Marsilid intramuskulär injiziert worden waren. Bei den mit Marsilid behandelten Tieren verursacht Dopa eine vollständige Diuresesperre von 1stündiger Dauer (Abb. 6). — Die Austestung der pressorischen Wirkung des in 4 Std sezernierten Harns (siehe Methodik) ergab, daß die mit Dopa und Marsilid behandelten Tiere fast doppelt so viel Oxytyramin ausgeschieden hatten wie die nur mit Dopa behandelten.

Bemerkungen

Die untersuchten Amine lassen sich in bezug auf die Beeinflußbarkeit ihrer Wirkungen durch *Marsilid* und *Methylenblau* in 2 Gruppen einteilen. Zu der *einen* gehören Nor-adrenalin, Adrenalin und Oxytyramin; zu der *anderen* Tyramin, Tryptamin und Oxytryptamin (Serotonin) (Tab. 1).

Tabelle 1

	Marsilid				Methylenblau		Cocain (nach Marsilid)	
	Blutdruck		Nickhaut		Blutdruck	Nickhaut	Blutdruck	Nickhaut
	1. Phase	2. Phase	1. Phase	2. Phase				
Nor-adrenalin	0	+	—	0	+	+	+++	+++
Adrenalin	0	+	—	0	+	+	+++	+++
Oxytyramin	0	+	—	0			+++	+++
Tyramin	+	++	—	++	++	+++	—	—
Tryptamin	+	++	—	++	++	+++	—	—
Oxytryptamin	?	?	—	++			—	—

Zeichenerklärung: 1. Phase 1—1½ Std nach Marsilid, 2. Phase 2—3 Std nach Marsilid. + Verstärkung der Wirkung, — Abschwächung der Wirkung, 0 ohne Einfluß; ? fraglich.

Marsilid und Methylenblau. Eine Blockade der Aminoxydase durch Marsilid oder Methylenblau ist für die Amine der ersten Gruppe von geringerer Bedeutung als für diejenigen der zweiten Gruppe. Zwar sind sowohl die Blutdruck- als die Nickhauteffekte bei allen Aminen verstärkt. Diese Verstärkung der Wirkung ist aber beim Adrenalin, Nor-adrenalin und Oxytyramin nur gering, beim Tyramin, Tryptamin und Oxytryptamin sehr deutlich.

Der Potenzierung der Aminwirkung durch Marsilid — nicht durch Methylenblau — geht eine 1—1½ stündige Phase der *Abschwächung* voraus. Diese betrifft nur die Nickhaut-, nicht die Blutdruckwirkung. Sie dürfte ihre Erklärung in der *sympathicolytischen* Wirkungskomponente des Marsilids finden, die zuerst am isolierten Aortenpräparat des Kaninchens nachgewiesen wurde und sich als ziemlich leicht

auswaschbar erwies. Diese sympathicolytische Wirkung klingt an der Nickhaut nach 1—1½ Std so weit ab, daß jetzt die Blockierung der Aminoxydase sich bei den Aminen der zweiten Gruppe im Sinne einer Verstärkung der Nickhautkontraktion auswirkt, die Amine der ersten Gruppe jedoch nur ihre anfängliche Wirksamkeit wiedererlangen. — Der sympathicolytische Effekt des Marsilids an der *Nickhaut* tritt nicht im Bereich der Gefäße auf. Am *Blutdruck* kommt es nach Marsilid nicht zu einer primären *Hemmung*, sondern nur zu einer Verstärkung der Wirkung.

Zur Erklärung der so verschiedenen Auswirkung einer Hemmung der Aminoxydase auf die Wirksamkeit der Brenzkatechinderivate einerseits, der Phenyl- und Indolylalkylamine andererseits läge es nahe, die zum Teil größenordnungsmäßig verschiedene *Dosierung* — beispielsweise 5 γ Adrenalin, 500—1000 γ Tyramin — verantwortlich zu machen. Das käme dann aber nicht für Oxytyramin in Frage, da dieses in der gleichen Größenordnung wie die Amine der zweiten Gruppe dosiert werden mußte. — Andererseits ist bekannt, daß die Einführung einer OH-Gruppe in die Seitenkette (Adrenalin, Nor-adrenalin) die Affinität zur Aminoxydase mindert, was aber wiederum für Oxytyramin nicht zuträfe, das ja auch eine besonders hohe Affinität zum Ferment besitzt.

So bliebe denn zunächst für eine Erklärung nur der schon in der Einleitung gegebene Hinweis übrig, daß die oxydative Desaminierung für die Amine der ersten Gruppe im Gegensatz zu denen der zweiten nicht der einzige Abbauweg ist, und deshalb eine Blockierung dieser *einen* von mehreren Möglichkeiten ihre Wirkung nicht so sehr beeinflußt.

Den Brenzkatechinabkömmlingen wird ein *direkter* pharmakologischer Angriffspunkt an der glatten Muskulatur selbst zugeschrieben; demgegenüber soll die Wirkung der Phenyl- und Indolylalkylamine wenigstens zum Teil eine *indirekte* sein, die in der Freisetzung von Sympathin besteht und somit die „Funktionstüchtigkeit" der postganglionären Faser voraussetzt. Fleckenstein hat die Amine dieses Wirkungstyps „*Neurosympathicomimetica*" genannt.

Die wirkungverstärkende Hemmung der Aminoxydase betrifft demnach hauptsächlich die *indirekte* Wirkung der Phenyl- und Indolylalkylamine und läßt die *direkte* Wirkung der Brenzkatechine und die Wirkung der elektrischen Nervenreizung fast unbeeinflußt. Das heißt aber, daß die Blockierung des Fermentes im *Erfolgsorgan nicht* die Ursache für die Wirkungsverstärkung der Neurosympathicomimetica sein kann; nur dann kommt es offensichtlich zu einer Verstärkung der Wirkung, wenn die Aminoxydase an *der* Stelle blockiert wird, an der die zur Freisetzung von Sympathin führende Wirkung der Neurosympathicomimetica ihren Angriffspunkt hat, d. h. im Bereich des postganglionären, markscheidenlosen Neurons, zu dem man vielleicht auch den „postganglionären Anteil" des Ganglions selbst rechnen darf.

Die postganglionäre, adrenergische Nervenstrecke und das Ganglion selbst sind reich an *Aminoxydase.* In einer voraufgegangenen Arbeit konnten wir zeigen, daß sie auch besonders viel *Dopadecarboxylase* und *Oxytyramin* enthalten (Holtz u. Westermann; Schümann). Wenn man unter Berücksichtigung dieser Tatsachen die Frage nach dem *Sinn* des hohen Gehaltes dieser Strukturen an Aminoxydase stellt, so kann dieser wohl kaum darin liegen, daß die Aminoxydase das von der

Dopadecarboxylase der Ganglien und Nerven gebildete Oxytyramin und das aus ihm entstehende und durch *physiologische* nervöse Impulse freiwerdende Noradrenalin zerstört. Er könnte aber darin liegen, eine Erregung des postganglionären Neurons durch körpereigene Amine vom Wirkungstyp der „Neurosympathicomimetica" und damit eine *unphysiologische*, weil nicht kontrollier- und steuerbare Freisetzung von Sympathin zu verhindern. So würde verständlich, daß eine Blockierung der Aminoxydase der Ganglien und Nerven durch Marsilid oder Methylenblau unter Durchbrechung dieses „Schutzmechanismus" zwar die „unphysiologische" — indirekte — Wirkung der Neurosympathicomimetica, nicht aber die „physiologische" — direkte — Wirkung der normalen Überträgerstoffe aus der Brenzkatechinreihe verstärkt.

Unter diesen Gesichtspunkten ist von besonderem Interesse, daß die Blutdruckwirkung des *Oxytyramins* durch Marsilid nur wenig verstärkt wird, die *Dopa*wirkung aber eine enorme Potenzierung erfährt.

Die Oxytyraminwirkung ist eine *direkte* Wirkung des in die Blutbahn injizierten Stoffes, die Dopawirkung eine *indirekte* Wirkung, indem nicht das in die Blutbahn injizierte Dopa, sondern das intermediär aus ihm entstehende Oxytyramin die Blutdrucksteigerung verursacht. Die Bildung von Oxytyramin aus Dopa findet wohl in größtem Maße in Leber und Niere statt. Auch hier nun führt die Blockierung der Aminoxydase offenbar dadurch zu einer Verstärkung der Wirkung, daß sie an Stellen erfolgt, an denen sich sozusagen die „*indirekte*" Wirkung, d. h. die Freisetzung, in diesem Falle die fermentative Bildung des Wirkstoffes (Oxytyramin) abspielt — Leber, Niere —, nicht aber dadurch, daß sie das Ferment da hemmt, wo Oxytyramin — z. B. an der Nickhaut und an den Gefäßen — seine „*direkten*" Wirkungen ausübt.

Cocain. Die Amine, deren Wirkungen durch Marsilid bzw. Methylenblau nicht oder nur wenig verstärkt werden — *Adrenalin, Nor-adrenalin, Oxytyramin* — erfahren durch *Cocain* eine besonders starke Wirkungssteigerung. Umgekehrt werden diejenigen, deren Blutdruck- und Nickhautwirkung Marsilid bzw. Methylenblau besonders deutlich verstärkt — *Tyramin, Tryptamin, Oxytryptamin* —, durch Cocain abgeschwächt (Abb. 1, 2, 4). Die Ergebnisse unserer vergleichenden Untersuchungen sind vielleicht geeignet, einen Beitrag zur Aufklärung des viel diskutierten *Mechanismus* dieser Cocainwirkungen zu liefern.

Die von Gaddum u. Kwiatowski zuerst für Ephedrin aufgestellte Hypothese von der Hemmung der Aminoxydase als Ursache der potenzierenden Wirkung auf Adrenalineffekte ist nicht mehr haltbar. Cocain sensibilisiert die verschiedensten Testobjekte — Blutdruck, Nickhaut, Kaninchenohrgefäße — schon in solchen Dosen für Adrenalin und Nor-adrenalin, die in *vitro* die Aminoxydase nicht hemmen; es sensibilisiert auch gegen Stoffe, die wie *Corbasil* von der Aminoxydase überhaupt nicht angegriffen werden, und schwächt andererseits die Wirkung solcher Amine, die wie Tyramin und Tryptamin besonders gut oxydierbare Substrate des Fermentes sind, ab. Eine *wirkliche* Hemmung der Aminoxydase, wie sie nach den von uns angewandten Marsiliddosen z. B. u. a. in Leber und Gehirn nachweisbar wird (siehe Zeller u. Barsky), führt auch zu einer Potenzierung der Tyramin- und Tryptamineffekte. Die Cocainwirkungen können deshalb wenigstens nicht in *direktem*

ursächlichen Zusammenhang mit einer Beeinflussung der Aminoxydaseaktivität stehen.

a) Die *Potenzierung* der *Brenzkatechin*derivate durch Cocain würde verständlicher, wenn man annehmen dürfte, daß ihr ein ähnlicher Mechanismus zugrunde läge wie der nach chirurgischer oder auch „pharmakologischer" Denervierung durch Ganglienblocker zustandekommenden Sensibilisierung der Erfolgsorgane für die Überträgerstoffe der Nervenwirkung. Die Cocaineffekte ließen sich dann CANNONS „Law of denervation" unterordnen.

Die nach chronischer chirurgischer Denervierung auftretende Sensibilisierung hat man nun auch wieder mit einer Abnahme der Aminoxydase an den Nervenenden zu erklären versucht (BURN). Diese Erklärung dürfte aber zumindest für eine durch *Ganglienblocker* und *Cocain* verursachte „pharmakologische" Denervierung kaum zutreffen, da nur schwer vorstellbar wäre, daß es in wenigen Minuten zu einem so erheblichen Fermentschwund kommt, abgesehen davon, daß eine tatsächliche Hemmung der Aminoxydase (Marsilid, Methylenblau) ja gerade *die* Amine, die durch Denervierung und Cocain stark potenziert werden — die Brenzkatechinderivate — nur sehr wenig in ihrer Wirkung beeinflußt.

Sicher aber stimmt die *„pharmakologische"* mit der *chirurgischen* Denervierung darin überein, daß an den Nervenenden im Erfolgsorgan weniger oder kein Überträgerstoff mehr frei wird. Das bedeutet für vegetativ innervierte Organe, deren Erregungszustand bis zu einem gewissen Grade der Menge des an den Nervenenden freiwerdenden Überträgerstoffes proportional ist, eine plötzliche Abnahme des Erregungszustandes. Dessen Höhe steht aber im reziproken Verhältnis zur *Erregbarkeit*. Im Maximum der *Erregung* ist die *Erregbarkeit* gleich Null und umgekehrt; je größer die im Organ freiwerdenden Wirkstoffmengen, je höher damit sein Erregungszustand, desto geringer die Erregbarkeit durch zusätzlichen Wirkstoff und umgekehrt. Die Potenzierung der Adrenalin-, Nor-adrenalin- und Oxytyraminwirkungen durch *Cocain* würde somit darin eine Erklärung finden, daß es wie bei der Denervierung zum Versiegen oder wenigstens zur Dämpfung der physiologischen kontinuierlichen Sekretion von Überträgerstoff kommt, damit aber zu einer *Abnahme* des Erregungszustandes und einer *Zunahme* der Erregbarkeit der Erfolgsorgane durch von außen einwirkende Wirkstoffe[1].

b) Die Wirkungen der *Phenyl-* und *Indolylalkylamine* — Tyramin, Tryptamin, Oxytryptamin — werden durch Cocain *abgeschwächt*. Der Cocainwirkung entsprechen wiederum die Verhältnisse nach *chirurgischer* Denervierung. Tyramin z. B. wirkt an der *denervierten* Nickhaut und Pupille weit schwächer als am *normalen* Organ. Sie stimmt nicht mit den Verhältnissen nach *„pharmakologischer"* Denervierung durch *Ganglienblocker* überein; nach Blockierung der sympathischen Ganglien ist die Tyramin- und Tryptaminwirkung nicht abgeschwächt (Abb. 7*B*).

[1] Näheres bei HOLTZ, P.: „Die Bedeutung der Ausgangslage für die Therapie". Regensburger Jahrb. f. ärztl. Fortbildung, Bd. III, 1953.

Die Abschwächung der Tyramin- und Tryptaminwirkung durch Cocain war besonders deutlich, wenn durch Hemmung der Aminoxydase mit Marsilid die *indirekte* Wirkung dieser Amine verstärkt worden war, die eine intakte und funktionstüchtige postganglionäre Nervenfaser voraussetzt (siehe Abb. 2 und 4). *Cocain* macht nun offenbar die postganglionäre Faser funktions*untüchtig*, in dem Sinne, daß es nicht nur wie bei der Ganglienblockade zu einem Versiegen der physiologischen kontinuierlichen Sekretion von Sympathin an den Nervenenden kommt, sondern darüber hinaus

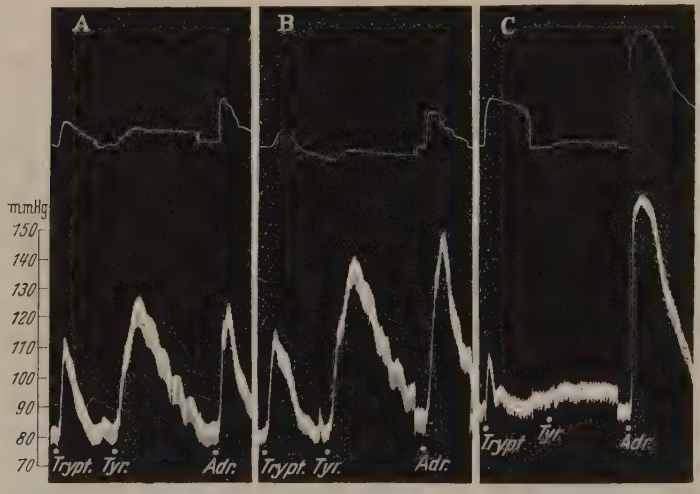


Abb. 7. *Tryptamin — Tyramin.* Einfluß von Ganglienblockern und Cocain. *Katze* 2,3 kg. Pernoctonnarkose. Künstliche Atmung. Obere Kurve: Nickhaut. Untere Kurve: Blutdruck. *Trypt.* 1 mg Tryptamin. *Tyr.* 1 mg Tyramin. *Adr.* 5 γ Adrenalin. *A* vor Pendiomid. *B* nach 2 mg/kg Pendiomid (N,N,N′,N′-3-Pentamethyl-N,N′-diäthyl-3-aza-pentylen-1,5-diammonium). *C* nach Cocain (5 mg/kg)

zu einer Aufhebung der *Erregbarkeit* der postganglionären Nervenstrecke durch „Neurosympathicomimetica", so daß deren „indirekte" Wirkung fortfällt und nur noch die „direkte" Wirkungskomponente übrigbleibt.

Das würde dann auch erklären, weshalb eine durch *Ganglienblocker* bewirkte „pharmakologische Denervierung" sich von einer durch *Cocain* verursachten unterscheidet. Nach der Ganglienblockade ist die postganglionäre Faser noch „funktionstüchtig", d. h. sie kann durch Neurosympathicomimetica noch zur Sekretion von Sympathin veranlaßt werden. Deshalb bleibt deren Wirkung nach Ganglienblockade erhalten. — Es wäre auch verständlich, daß die „Denervierung" durch Cocain der *chirurgischen* Denervierung mit anschließender Nervdegeneration entspricht. In beiden Fällen können die Neurosympathicomimetica ihre indirekte Wirkung — postganglionäre Freisetzung von Sympathin — nicht mehr ausüben; in beiden Fällen ist deshalb ihre Wirkung abgeschwächt oder aufgehoben.

Das Ausmaß dieser Abschwächung wird von dem Anteil abhängen, den die *indirekte* Wirkungskomponente an der Gesamtwirkung des betreffenden Amins hat. In diesem Punkt unterscheiden sich *Tyramin* und *Tryptamin* voneinander. Die Tryptaminwirkung ist in höherem Maße als die Tyraminwirkung eine „direkte". Verstärkt man die „indirekte" Wirkungskomponente der beiden Amine nicht wie in den früheren Versuchen (Abb. 2 und 4) mit Marsilid, so wird trotzdem die *Tyramin*wirkung an der Nickhaut durch Cocaindosen praktisch aufgehoben, welche die *Tryptamin*wirkung entweder unverändert lassen oder sogar verstärken (Abb. 7*C*). Von dem Ausmaß, in dem die *indirekte* Wirkungskomponente eine *Abschwächung* und die *direkte* eine *Verstärkung* erfährt, wird es abhängen, ob die Gesamtwirkung eines Amins durch Cocain potenziert oder vermindert wird, oder ob sie unverändert bleibt. *Tryptamin*, bei dem beide Wirkungskomponenten sich ungefähr die Waage halten, würde in die Gruppe der „Intermediärstoffe" Fleckensteins gehören.

Eine gewisse Diskrepanz bleibt bei dieser Deutung noch bestehen. Wenn Cocain tatsächlich die „unphysiologische" Freisetzung von Sympathin durch die *Neurosympathicomimetica* unmöglich macht, so wäre zu erwarten, daß es auch seine „physiologische" Freisetzung durch prä- oder postganglionäre *elektrische* Reizung verhindert. Cocaindosen aber, nach denen die *Tyramin*wirkung an der Nickhaut abgeschwächt ist, können die präganglionäre *elektrische* Erregbarkeit unbeeinflußt lassen. Bei dieser Diskrepanz handelt es sich aber wohl nur um graduelle Unterschiede bzw. um eine Frage der Dosierung. In einer Arbeit von Fleckenstein ist ein Versuch dargestellt, in dem die Dosis von 5 mg/kg Cocain, die zu einer starken Abschwächung der Nickhautwirkung des *Tyramins* geführt hätte, die Kontraktionen der Nickhaut bei elektrischer Reizung des Nerven noch unbeeinflußt läßt. Die Dosis von 7,5 mg/kg hebt aber auch diese auf.

Summary

1. Contrary to the *Catecholamines* adrenaline, nor-adrenaline and hydroxytyramine (Dopamine) the action on the bloodpressure and the nictitating membrane of the *Phenyl-* and *Indolylalkylamines* tyramine, tryptamine and 5-hydroxy-tryptamine (Serotonine) is strongly enhanced by inhibition of the mono-aminooxydase with Marsilid ("Isoproniacid") or Methylenblue. Like the action of the catecholamines the effect on the nictitating membrane of praeganglionic electrical stimulation is *not* enhanced.

This different behaviour is explained by assuming, that by inhibition of the enzyme the *indirect*, i. e. sympathin liberating action of the amines is potentiated, not the *direct* action on plain muscle which is the only one of the catecholamines. Therefore the aminooxydase of the *nerves*, not of the *effector cells* has to be blocked to bring about the enhancement of the effects of tyramine, tryptamine and serotonine.

The physiological purpose of the high aminooxydase activity of the nerves could be to protect them against the sympathin—liberating, indirect action of body-own amines like tyramine, and the effector cells against undisired excitations, i. e. excitations not under control.

2. This view is supported by the results of experiments with *cocaine*. Cocaine enhances the *direct* action of all amines. Therefore the effects of the catecholamines are strongly potentiated by cocaine, but the effects of the other amines only in so far as their action is a direct one. Because tryptamine has a higher proportion of *direct* action as tyramine its effect on the nictitating membrane can be enhanced by cocaine, whereas the nearly pure *indirect* action of tyramine is always inhibited (Fig. 7). Is however by blocking of the aminooxydase the ratio direct action: indirect action in favour of the latter, also the effect of *tryptamine* on the nictitating membrane will be inhibited by cocaine (Fig. 2, 4).

3. That cocaine does *potentiate* the *direct* actions of the amines is explained by Cannons "Law of denervation". Like postganglionic denervation *cocaine* may abolish the physiological continual secretion of sympathin on the nerve-endings. Therefore the "*state of excitation*" of the denervated resp. cocainised organ will be decreased whereas its "*excitability*" by the transmitter substances is *increased*, because excitation and excitability are reciprocal. This cocaine-effect obviously can be brought about by doses which the *electrical* excitability leave intact.

That cocaine *inhibits* the *indirect* actions of the amines (tyramine, tryptamine, serotonine) is explained by its paralysing action on the postganglionic neuron which makes it refractory against the sympathin liberating excitation by these amines.

Literatur

Blaschko, H.: Pharmacol. Rev. **4**, 444 (1952). — Burn, J. H., and J. Robinson: Brit. J. Pharmacol. **7**, 304 (1952). — Euler, U. S. v.: Arch. internal. Pharmacodynamie **77**, 477 (1948). — Euler, U. S. v., u. B. Zetterström: Acta physiol. scand. (Stockh.) **33** (Suppl. 118), 26 (1955). — Fleckenstein, A., and J. H. Burn: Brit. J. Pharmacol. **8**, 69 (1953). — Fleckenstein, A., u. H. Bass: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **220**, 143 (1953). — Fleckenstein, A., u. D. Stöckle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 401 (1955). — Furchgott, R. F.: Pharmacol. Rev. **7**, 183 (1955). — Gaddum, J. H., and H. Kwiatowski: J. of Physiol. **94**, 87 (1930). — Griesemer, E. C., J. Barsky, C. A. Dragstedt, J. A. Wells and E. A. Zeller: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **84**, 699 (1953). — Griesemer, E. C., C. A. Dragstedt, J. A. Wells u. E. A. Zeller: Experientia (Basel) **11**, 182 (1955). — Holtz, P., u. K. Credner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **200**, 356 (1942). — Holtz, P., u. F. Bachmann: Naturwissenschaften **39**, 116, 235 (1952). — Holtz, P., K. Credner u. F. Heepe: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 85 (1947). — Holtz, P. u. E. Westermann: Naturwissenschaften **42**, 647 (1955); Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 538 (1956). — Philpot, F. J.: J. of Physiol. **97**, 301 (1940). — Schayer, R. W., and R. C. Smiley: J. of Biochem. **202**, 425 (1953). — Schümann, H. J.: Naturwissenschaften **43**, 37 (1956); Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 566 (1956). — West, G. B.: J. of Pharmacy a. Pharmacol. **3**, 656 (1951). — Zeller, E. A. u. a.: Experientia (Basel) **8**, 349 (1952). — Zeller, E. A., and J. Barsky: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **81**, 459 (1952).

Prof. Dr. P. Holtz,
Frankfurt/M., Ludwig-Rehn-Str. 14, Pharmakol. Institut der Universität

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 559—565 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Über die Natur des Überträgerstoffes vagal-motorischer Magenerregungen

Von
K. Greeff und P. Holtz

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. Dezember 1955)

Während die Funktion des *Acetylcholins* als Überträgerstoff parasympathischer Nervenerregungen durch die Untersuchungen von Loewi, Dale, Feldberg, Gaddum u. a. als gesichert gelten darf, bestehen Zweifel, ob ihm diese Funktion auch für die Motorik des *Magen-Darmtraktes* zukommt. Wie bei anderen parasympathisch innervierten Organen, so ließ sich zwar auch im abfließenden Venenblut des Magens und Darms bei elektrischer Reizung des Vagus vermehrt Acetylcholin nachweisen (Dale u. Feldberg), doch wäre hier der Einwand möglich, das vermehrt nachweisbare Acetylcholin sei nicht im Bereich der glatten Muskulatur, sondern im Bereich der Drüsen freigesetzt worden. Der wichtigste Einwand aber gegen Acetylcholin als einzigen Überträgerstoff parasympathisch-motorischer Impulse am Magen und Darm stützt sich auf die zuerst von Bayliss und Starling sowie von Cushny beschriebene *Atropinresistenz* des Vagusreizes am Magen des Hundes. Auch Dixon fand in Versuchen am Froschmagen, daß der elektrische Vagusreiz sich durch Atropin nicht aufheben ließ, und in jüngster Zeit hat Vogt ebenfalls in Versuchen am Froschmagen Anhaltspunkte dafür gefunden, daß es bei Vagusreizung zur Freisetzung eines atropinresistenten Stoffes kommt. Die in einer früheren Arbeit beschriebene Methodik eines isolierten Vagus-Magenpräparates des Warmblüters erschien geeignet, die Frage der humoralen Übertragung vagal-motorischer Erregungen erneut zu untersuchen.

Methodik

Für die Versuche benutzten wir *Ratten* (150—200 g), *Meerschweinchen* (250 bis 300 g) und *Kaninchen* (1—2 kg). Die Präparation des Vagus-Magen-Präparates erfolgte in der von Greeff und Holtz angegebenen Weise, indem der Magen mitsamt dem Oesophagus und den daraufliegenden Vagusnerven frisch getöteten Tieren entnommen wurde und die beiden Vagusnerven einer Schnabelelektrode angelegt wurden. Die Präparate waren in einem Tyrodebad von 40 cm^3 bei 35° C suspendiert. Die Reizung erfolgte mit Hilfe eines Rechteckimpulsgenerators mit 20—40 Hz, 0,5—1 msec und wechselnden Stromstärken. In einigen Versuchen

wurde mit der Längsmuskulatur auch das Magenvolumen registriert: es wurde vom Pylorus her eine mit einem Wassermanometer verbundene Glaskanüle in den Magen eingebunden; die Übertragung erfolgte durch Lufttransmission auf eine Mareysche Kapsel. Der Druck betrug 2—3 cm Wasser.

Zum Nachweis der *humoralen Übertragung* des Vagusreizes wurde ein etwa 4 cm langes *Ileumstück* des gleichen Tieres als Testobjekt zusammen mit dem an der großen Kurvatur aufgeschnittenen Magen in 20 cm³ Tyrode suspendiert.

Versuche

Wenn der bei elektrischer Vagusreizung freiwerdende Überträgerstoff *Acetylcholin* wäre, müßte seine Wirkung sich durch *Atropin* verhindern und durch *Eserin* verstärken lassen. Es war damit zu rechnen, daß sein Nachweis nur in Gegenwart von Eserin gelingen würde. Wir haben zunächst untersucht, wie die Erregungswirkung des Vagusreizes und des Acetylcholins am Magenpräparat durch Atropin und Eserin beeinflußt wird, und zum Vergleich auch Carbaminoylcholin (Doryl) verabfolgt, das durch die Cholinesterase nicht angegriffen wird und dessen Wirkung deshalb durch Eserin nicht verstärkt werden dürfte.

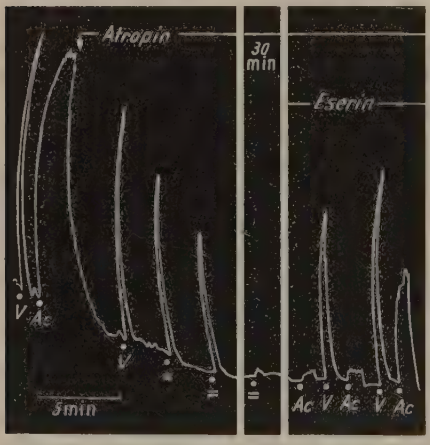


Abb. 1. Einfluß von Atropin und Eserin auf die Wirkung des elektrischen Vagusreizes. Meerschweinchen-Präparat: Atropin. sulfur. 1:10 Millionen; Eserin 1:2 Millionen. *V* elektr. Vagusreizung (4 mA; 0,4 msec; 20 Hz; 15 sec). *Ac* 10 γ Acetylcholin

1. Einfluß des Atropins und Eserins auf die Erregungswirkung des Vagusreizes sowie des Acetyl- und Carbaminoylcholins

In Bestätigung der in einer vorhergehenden Arbeit (Greeff und Holtz) mitgeteilten Beobachtung hebt eine kleine *Atropin*dosis die durch Acetylcholin verursachte Kontraktion der Magenmuskulatur *prompt* auf, während der Vagusreiz erst nach *längerer* Einwirkung von Atropin unwirksam wird (Abb. 1). Läßt man jetzt auf das auch weiterhin unter Atropinwirkung stehende Präparat *Eserin* einwirken, so gewinnt es allmählich seine Ansprechbarkeit zurück. Bemerkenswert ist, daß der Vagusreiz eher wieder wirksam wird als Acetylcholin. — Der in der Abb. 2 dargestellte Versuch, in dem neben den Kontraktionen der Längsmuskulatur auch das Magenvolumen registriert wurde, zeigt, daß auch die Kontraktionswirkung des durch die Cholinesterase nicht angreifbaren *Doryls* atropinempfindlicher ist als die Wirkung des Vagusreizes, die ihrerseits durch den Ganglienblocker Hexamethonium prompt und reversibel aufgehoben wird.

Der Resistenz des Doryls gegenüber der Cholinesterase entspricht, daß es seine durch Atropin aufgehobene Wirkung bei Einwirkung von Eserin nicht wieder erlangt, während der Vagusreiz wiederum trotz Anwesenheit von Atropin wirksam wird. Diese am Vagus-Magenpräparat von Meerschweinchen erhobenen Befunde ließen sich in Versuchen am Kaninchen- und Rattenmagen bestätigen (Abb. 3).

Es ist bekannt, daß die depolarisierende Wirkung des in der motorischen Endplatte des *quergestreiften* Muskels freiwerdenden Acetylcholins, die zur Kontraktion des Muskels führt, sich auf die Muskelfaser selbst erstreckt und dann kontraktions-*hemmend* wirkt, wenn es — z. B. durch Eserin — zu einer Anhäufung von Acetylcholin in der Endplatte kommt. Ein ähnliches Phänomen läßt sich am Vagus-Magen-Präparat demonstrieren. Reizt man den Vagus bei gleichbleibender Stromstärke (mA-Zahl) das eine Mal mit einer *hohen* Frequenz (20 Herz), das andere Mal mit einer *niedrigen* (2 Herz), so wird die Kontraktion der Magenmuskulatur im ersten Fall durch Eserin *abgeschwächt*, im zweiten Fall *verstärkt* (Abb. 4).

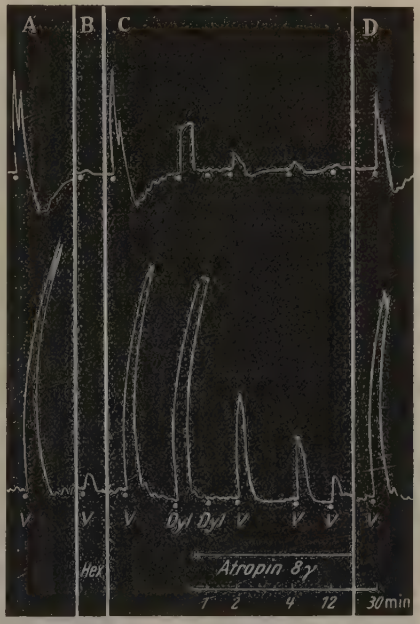


Abb. 2. Meerschweinchenpräparat. Obere Kurve Volumenschreibung. Untere Kurve Längsmuskelschreibung. *V* elektr. Vagusreiz (16 mA; 0,5 msec; 20 Hz; 20 sec). *Dyl* 25 γ Doryl. *Hex* 400 γ Hexamethonium

2. Humorale Übertragung der Vaguswirkung

Suspendiert man in dem Tyrodebad, in dem das Vagus-Magenpräparat sich befindet, ein Stück *Ileum* des gleichen Tieres und reizt jetzt den Vagus elektrisch, so kann es zusammen mit der Magenkontraktion zu einer Kontraktion des Darmes kommen. Nach unseren in zahlreichen Versuchen gemachten Erfahrungen kommt es aber nur dann zu einer Kontraktion auch des Darmes, wenn dieser eine besonders hohe Empfindlichkeit gegen Acetylcholin besitzt, d. h. sich im 20 cm^3-Tyrodebad auf 0,05—0,1 γ Acetylcholin kontrahiert. In dem Versuch der Abb. 5A war das nicht der Fall. Aber auch in diesem Versuch kam es im Anschluß an die nur 10 sec dauernde elektrische Reizung des Vagus zu einer deutlichen Darmkontraktion, nachdem wir 1 γ Eserin in die Badflüssigkeit gegeben hatten. Das spricht dafür, daß die Wirkung des bei der Vagusreizung im Magen freigesetzten Überträgerstoffes sich durch Eserin verstärken läßt, und daß er — bei dem bekannten Wirkungsmechanismus

des Eserins — ein durch die Cholinesterase spaltbarer Cholinester ist. Dafür spricht auch, daß Atropin, das ja bekanntlich die *Freisetzung* des Überträgerstoffes bei elektrischer Reizung des Nerven nicht verhindert,

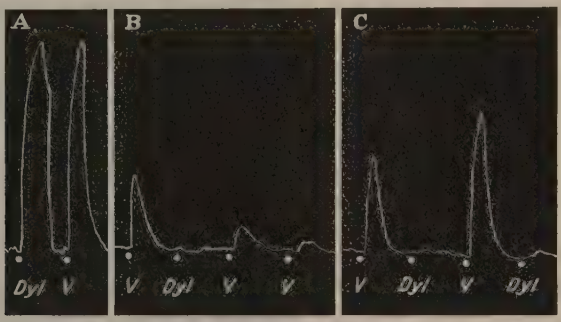


Abb. 3. Beeinflussung der Doryl- und Vaguswirkung durch Atropin und Eserin. Kaninchenpäparat: *B:* 20 min vorher Atropin. sulf. 1:4 Millionen; *C:* zusätzlich Eserin 1:2 Millionen. *Dyl* 40 γ Doryl. *V* elektr. Vagusreiz (20 mA; 0,5 msec; 20 Hz; 15 sec)

Abb. 4

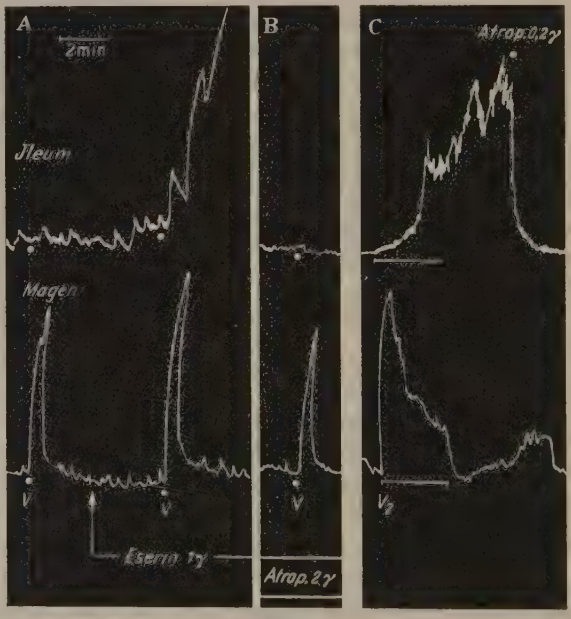


Abb. 5

Abb. 4. Beeinflussung der vagalen Erregung durch Eserin in Abhängigkeit von der Reizfrequenz. Meerschweinchenpräparat: V_1 elektr. Vagusreiz (10 mA; 0,5 msec; 20 Hz; 30 sec). V_2 wie V_1, jedoch 2 Hz; 60 sec. Eserin 1:10 Millionen

Abb. 5. Humorale Übertragung der vagalen Magenerregung (s. Text). Meerschweinchenpräparat: Obere Kurve Test-Ileum. Untere Kurve Vagus-Magenpräprat. Versuch 1 (A, B): *V* elektr. Vagusreiz (20 mA; 1 msec; 30 Hz; 10 sec). Versuch 2 (*C*): V_2 elektr. Vagusreiz (18 mA; 0,5 msec; 20 Hz; 2,5 min)

sondern nur dessen *Wirkung*, und — wie im Vorgehenden dargelegt — die vagal ausgelöste *Magen*kontraktion erst bei längerer Einwirkung unterdrücken würde, trotzdem die *Darm*kontraktion verhindert (Abb. 5B). — In dem an einem anderen Präparat vorgenommenen Versuch der Abb. 5C kam es während einer längeren Vagusreizung (2,5 min) auch ohne Eserin zu einer langdauernden Kontraktion des Testdarmes. Diese ließ sich wie die durch von außen zugegebenes — „humoral" wirkendes — Acetylcholin verursachte mit einer kleinen Atropindosis prompt aufheben (Abb. 5C).

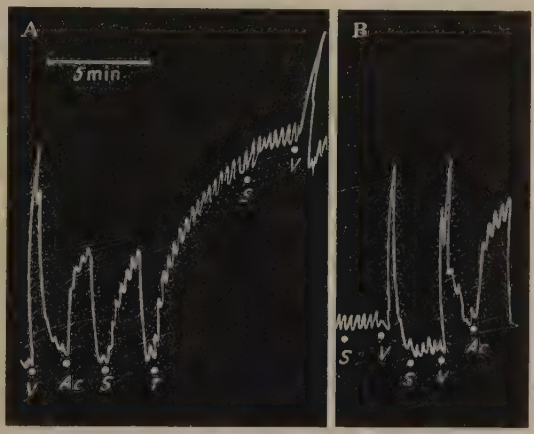


Abb. 6. Hohe Tryptamindosen lässen die vagale Erregung unbeeinflußt. Rattenpräparat: *V* elektr. Vagusreiz (30 mA; 1 msec; 20 Hz; 30 sec). *Ac* 4 γ Acetylcholin; *S* 4 γ Serotonin (5-Oxytryptamin). *T* 400 γ Tryptamin. — *B* nach Badwechsel

Von bekannten chemisch definierten, körpereigenen darmerregenden Stoffen käme *Oxytryptamin* bzw. Serotonin als ein atropinresistenter vagaler Überträgerstoff im Bereich des Magen-Darmtraktes — wenn es einen solchen gäbe — in Frage, da es hier in reichlichem Maße vorhanden ist und seine Erregungswirkung gegen Atropin unempfindlich sein soll (Rocha e Silva). Zur Differenzierung haben wir uns die kompetitive Hemmbarkeit der Serotoninwirkung durch *Tryptamin* (Gaddum) zunutze gemacht. Am Vagus-Magenpräparat der *Ratte* ließ sich die Serotoninerregung, nicht jedoch die Vaguswirkung durch Tryptamin verhindern (Abb. 6). Das spricht dagegen, daß Oxytryptamin maßgeblich an der chemischen Übertragung der Vaguserregung beteiligt ist.

Bemerkungen

Unsere Versuche am isolierten Vagus-Magenpräparat haben keine Anhaltspunkte dafür gegeben, daß an der humoralen Übertragung der Vaguswirkung ein atropinresistenter Überträgerstoff beteiligt ist, wie ja auch die vagale Erregung selbst nicht atropin*resistent*, wenn auch weniger atropin*empfindlich* ist als die Wirkung von außen zugesetzten Acetylcholins. Das findet eine Parallele darin, daß auch die Erregungswirkungen *sympathischer* Nerven durch Sympathicolytica schwerer hemmbar sind als die Wirkung der in die Blutbahn injizierten Überträgerstoffe.

Die an den Nervenenden im Erfolgsorgan bei der Erregung freiwerdenden Überträgerstoffe sind offenbar antagonistischer Beeinflussung durch Sympathico- und Parasympathicolytica schwerer zugänglich als hämatogen — von außen — einwirkende Pharmaka. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen stehen vielmehr im Einklang mit der Annahme, daß *Acetylcholin*, wie in anderen Bereichen parasympathischer Innervation, so auch im Magen-Darmtrakt der Überträgerstoff der motorischen Vaguswirkung ist.

Wenn *Atropin* am Vagus-Magenpräparat nach längerer Einwirkung nicht nur Acetylcholin, sondern auch den Vagusreiz unwirksam gemacht hat, so erlangt bei zusätzlicher Verabfolgung von *Eserin* der Vagusreiz seine Wirksamkeit *eher* wieder als Acetylcholin.

Hier besteht also die umgekehrte zeitliche Reihenfolge wie bei der Atropinhemmung. Das wäre verständlich, wenn man annehmen dürfte, daß in Analogie zum *quergestreiften* Muskel auch im *glatten* Muskel die Cholinesterase sich an den nervalen Endstrukturen in besonders starker Anhäufung befindet und ihre Blockierung durch Eserin deshalb eine weit stärkere Wirksamkeitssteigerung des bei der Vagusreizung an diesen Stellen freiwerdenden Acetylcholins bedeuten würde als die Blockierung des in geringerer Konzentration sich im ganzen Muskel verteilenden Fermentes für das von außen einwirkende Acetylcholin.

Andererseits schließen unsere Versuche die prinzipielle Möglichkeit nicht aus, daß die Hemmung der vagalen Erregung durch *Atropin* ihren Angriffspunkt nicht nur an den Endverästelungen der postganglionären Nervenstrecke hat, sondern auch im *Ganglion*. Denn es ist bekannt, daß höhere Atropindosen die ganglionäre Erregungsübertragung zu hemmen vermögen (Cahen u. Trede, Feldberg u. Vartiainen, Konzett u. Rothlin). In einer folgenden Arbeit, die sich u. a. mit der Beeinflussung der pressorischen *Cholin*wirkung durch Atropin befaßt, werden wir selbst Belege für diese Atropinwirkung geben (Greeff, Westermann u. Bohné). Immerhin machen unsere Versuche mit *Eserin* es unwahrscheinlich, daß diese zwar prinzipiell mögliche ganglionäre Wirkung maßgeblich an der Hemmung der vagalen Erregung durch die kleinen hierzu ausreichenden Atropinkonzentrationen (1:10 Millionen) beteiligt ist: die Blockierung der Vaguswirkung durch *Hexamethonium* und andere spezifische Ganglienblocker läßt sich durch *Eserin* nicht durchbrechen, wohl aber die Atropinhemmung (s. Abb. 1). Auch die *Resistenz* der *direkten* elektrischen Erregungswirkung gegen *Ganglienblocker* und ihre *Empfindlichkeit* gegen *Atropin* (Greeff u. Holtz) spricht dafür, daß Acetylcholin an den Endigungen des postganglionären Neurons in der glatten Muskulatur des Magens der Überträger der Nervenwirkung ist.

Summary

1. On the isolated preparation of the vagus and stomach of guinea-pigs, rabbits and rats atropine abolishes immediately the action of acetylcholine whereas it takes several minutes to abolish the effect of electrical vagal stimulation.

2. On this preparation electrical stimulation of the vagus sets free a substance which contracts an isolated test-ileum suspended in the same Tyrode-bath. The effect of the transmitter is abolished by *atropine*, enhanced by *eserine*.

3. The results indicate that also in the *digestive* tract *acetylcholine* is the transmitter of parasympathetic-motor nerve impulses; they do not support the view of liberation of an *atropine-resistant* transmitter. — High doses of tryptamine which on the intestine inhibit the action of 5-oxytryptamine do not influence the effect of electrical vagal stimulation.

Literatur

Bayliss, W. M., and E. H. Starling: J. of Physiol. **24**, 99 (1899). — Cahen, R. L., et K. M. Trede: Arch. internat. Pharmacodynamic **94**, 248 (1953). — Cushny, A. R.: J. of Physiol. **41**, 233 (1910/11). - Dale, H. H., and W. Feldberg: J. of Physiol. **81**, 320 (1934). — Dixon, W. E.: J. of Physiol. **28**, 57 (1903). — Feldberg, W., and A. Vartiainen: J. of Physiol. **83**, 103 (1935). — Gaddum, J. H., and Khan A. Hameed: Brit. J. Pharmacol. **9**, 240 (1954). — Greeff, K., u. P. Holtz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 427 (1956) — Greeff, K., E. Westermann u. G. Bohné: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (im Druck). — Konzett, H., u. E. Rothlin: Helvet. physiol. Acta **7**, 46 (1949). — Rocha e Silva, M., J. R. Valle and Z. P. Picarelli: Brit. J. Pharmacol. **8**, 378 (1953). — Vogt, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 1 (1949).

Prof. Dr. P. Holtz, Frankfurt/M., Pharmakol. Institut d. Univ., Ludwig-Rehn-Str. 14

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 227, S. 566—573 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Nachweis von Oxytyramin (Dopamin) in sympathischen Nerven und Ganglien*

Von
H. J. Schümann

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. Dezember 1955)

In einer voraufgegangenen Arbeit wurde von Holtz und Westermann über das Vorkommen und die Verteilung der *Dopadecarboxylase* im Nervensystem berichtet. Die Fermentaktivität, die in postganglionären sympathischen Nerven (Milznerven), sympathischen Ganglien (ggl. stellata) und im Grenzstrang am höchsten war, stand in Beziehung zum Noradrenalingehalt des betreffenden Gewebes. Oxy- und Dioxyphenylserine wurden nur wenig oder überhaupt nicht decarboxyliert. Es war somit wahrscheinlich, daß *Oxytyramin (Dopamin)* — das Produkt der Dopadecarboxylasewirkung — Muttersubstanz des im Nervengewebe vorhandenen Noradrenalins ist, und es erschien der Versuch lohnend, Oxytyramin in *sympathischen Nerven* und *Ganglien* nachzuweisen.

Methodik

1. Extraktherstellung

Milznerven und Ganglien (ggl. stellata) frisch geschlachteter Ochsen wurden nach Entfernung des anhängenden Gewebes noch auf dem Schlachthof unter Salzsäure-Alkohol (1 cm³ konz. HCl/1000 cm³ Alkohol) mit der Schere zerkleinert, im Multimix homogenisiert und mit der 10fachen Gewichtsmenge Salzsäure-Alkohol 1 Std im Eisschrank extrahiert. Nach dem Abnutschen wurde der Rückstand noch einmal mit der doppelten Menge salzsauren Alkohols extrahiert, erneut abgenutscht und die vereinigten Filtrate im Vakuum bei 50° C bis fast zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde in n-Butanol (gesättigt mit n/10 HCl) aufgenommen und die Lösung 3mal mit je 20 cm³ n/100 HCl im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Nach dem Vertreiben der Butanolreste im Vakuum wurde die saure wäßrige Lösung mit 10 cm³ 10%iger Aluminiumsulfatlösung pro 100 g Gewebe versetzt. Die Brenzkatechine werden an das auf Zusatz von 0,5 n-NaOH sich bildende Aluminiumhydroxyd bei p_H 7,6 adsorbiert und nach der von v. Euler (1948) angegebenen Methode wieder in wäßrige Lösung gebracht. Diese wird nach der Austestung am Rattenblutdruck im Vakuum wieder zur Trockene eingedampft und der Rückstand in soviel HCl-Alkohol aufgenommen, daß 0,15 cm³ der Blutdruckwirksamkeit von 25 γ Noradrenalin entspricht.

* Kurze Mitteilung siehe H. J. Schümann: Naturwiss. **1956**, 37.

2. Testung am Blutdruck

a) An 200—300 g schweren männlichen Ratten wurde in Urethannarkose (175 mg/100 g Ratte subcutan) der Blutdruck mit einem Hg-Manometer in der Arteria carotis registriert. Die Tiere hatten 20 mg/kg Heparin erhalten. Sperrflüssigkeit 0,9%ige NaCl-Lösung. ¼ Std vor Versuchsbeginn wurde 1 mg/kg Atropin sulf. und 10 mg/kg Hexamethonium intravenös injiziert.

b) Die Versuche an *Meerschweinchen* wurden ebenfalls in Urethannarkose durchgeführt. Die Tiere erhielten zu Beginn Heparin und Atropin. Sperrflüssigkeit: $^2/_3$ NaCl-Lösung (0,9%) + $^1/_3$ Natriumcitrat (3,8%).

3. Papierchromatographie

Auf Sch. & Sch.-Papier (Nr. 2043b), das mit n/100 HCl gewaschen und wieder getrocknet worden war, wurde 1. *ascendierend* in 85% Phenol + 15% n/10 HCl (M. Vogt), 2. *descendierend* in n-Butanol-N-HCl (Hamberg und v. Euler) bei 24° C in CO_2-Atmosphäre 24—30 Std chromatographiert. Das an der Luft getrocknete Papier wurde zur Entfernung des Phenols mit Benzol gewaschen und lufttrocken mit einer 0,44%igen Kaliumferricyanidlösung in 0,2 mol Phosphatpuffer vom p_H 7,8 zur Entwicklung des Chromatogramms besprayt (James, 1948).

Die Elution nicht besprayter Chromatogramme erfolgte an Hand von Test-Chromatogrammen aus waagerecht herausgeschnittenen Streifen mit 0,4%iger NaH_2PO_4-Lösung, der 1 mg/100 cm³ Ascorbinsäure zugesetzt war, nach der von Crawford und Outschoorn angegebenen Methode. Die nach 15stündiger Elution erhaltenen Eluatmengen betrugen etwa 3 cm³.

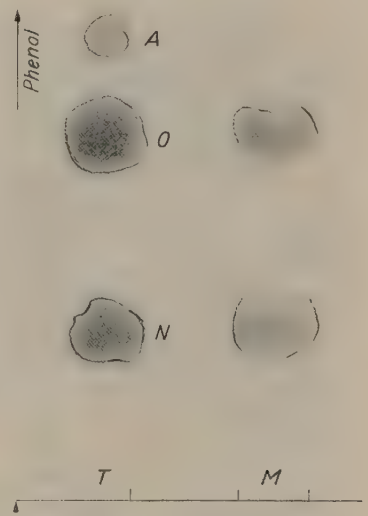


Abb. 1. Papierchromatogramm eines *Milznervenextraktes* (*M*), verglichen mit einer Testlösung von *Noradrenalin*, *Oxytyramin* und *Adrenalin* (*T*). Lösungsmittel: Phenol-HCl. — Laufzeit 29 Std. Entwicklung mit Kaliumferricyanid. (siehe Text) *N* Noradrenalin. *O* Oxytyramin. *A* Adrenalin

Versuche

1. Chromatographischer Nachweis von Oxytyramin in Milznerven

a) In dem Versuch der Abb. 1 wurde 0,15 cm³ Milznervenextrakt, die sich am Rattenblutdruck als mit 25 γ Noradrenalin äquivalent erwiesen hatten, in 1,5 cm Breite auf der Startlinie aufgetragen (*M*), daneben in 1,0 cm Breite 0,10 cm³ eines Gemisches von 15 γ Noradrenalin, 15 γ Oxytyramin und 5 γ Adrenalin (*T*). Es wurde ascendierend in Phenol-HCl chromatographiert. Nach 29 Std wurde mit Kaliumferricyanid entwickelt.

Das Chromatogramm des Extraktes (*M*) zeigt zwei nach Umfang und Farbintensität etwa gleichstarke Flecke: der R_f-Wert des einen stimmt mit demjenigen des *Noradrenalins*, der R_f-Wert des anderen mit

demjenigen des *Oxytyramins* des Leitchromatogramms überein. Für das Vorhandensein von *Adrenalin* gibt das Chromatogramm des Extraktes keinen Anhaltspunkt.

Das Brenzcatechinderivat des Milznervenextraktes mit der Wanderungsgeschwindigkeit des Noradrenalins färbte sich bei der Entwicklung mit Kaliumferricyanid rot und fluorescierte im UV-Licht hellgrün wie das *Noradrenalin* des Testchromatogramms; die Substanz mit der Wanderungsgeschwindigkeit des Oxytyramins färbte sich mit Kaliumferricyanid blaurot und fluorescierte tief violett-blau wie das *Oxytyramin* des Testchromatogramms. — 6 weitere Versuche mit Milznervenextrakten hatten das gleiche Ergebnis.

Abb. 2

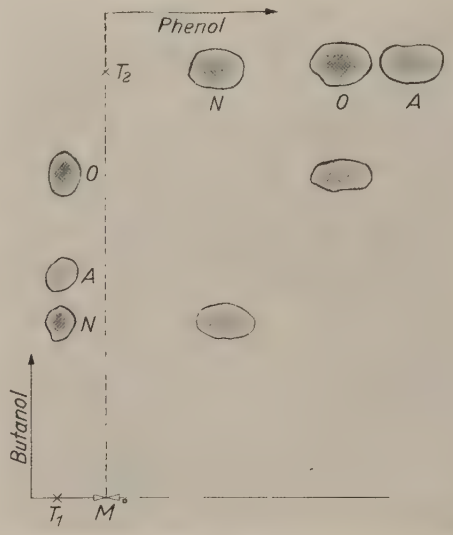


Abb. 3

Abb. 2. Papierchromatogramm eines *Milznervenextraktes* (*M*), verglichen mit einer Testlösung von je 10 γ *Noradrenalin, Adrenalin* und *Oxytyramin*. Lösungsmittel: n-Butanol-HCl. — Laufzeit 24 Std. Entwicklung mit Kaliumferricyanid. *N* Nor-adrenalin. *O* Oxytyramin. *A* Adrenalin

Abb. 3. Zweidimensonales Chromatogramm eines *Milznervenextraktes* (*M*), verglichen mit einer Testlösung von *Noradrenalin, Adrenalin* und *Oxytyramin*. T_1 Testchromatogramm in n-Butanol-HCl descendierend (24 Std); T_2 Testchromatogramm in Phenol-HCl ascendierend (24 Std). (T_1 wurde zur Entwicklung mit Kaliumferricyanid abgeschnitten und die Testlösung (T_2) zur ascendierenden Chromatographie in Phenol-HCl erneut aufgetragen.) *N* Noradrenalin. *O* Oxytyramin. *A* Adrenalin.

b) Bei Verwendung von Butanol-HCl als Lösungsmittel ist die Wanderungsgeschwindigkeit des Oxytyramins nicht wie bei der Chromatographie mit Phenol kleiner, sondern größer als diejenige des Adrenalins (Abb. 2, *T*). Die beiden Flecken des Extrakt-Chromatogramms entsprechen auch jetzt bei der descendierenden Chromatographie mit Butanol-HCl wiederum dem Noradrenalin- bzw. Oxytyraminfleck des Leitchromatogramms (Abb. 2, *M*).

c) Schließlich bestätigten auch Versuche mit 2-dimensionaler Chromatographie, in denen zuerst mit Butanol, anschließend mit Phenol als

Lösungsmittel gearbeitet wurde, das Vorkommen von Oxytyramin neben Noradrenalin im Milznervenextrakt (Abb. 3).

2. Biologischer Nachweis von Oxytyramin in Milznervenextrakten

Zur weiteren Charakterisierung und Identifizierung der chromatographisch sich wie Oxytyramin verhaltenden Substanz der Milznervenextrakte haben wir die zuerst von Holtz und Credner gemachte Beobachtung benutzt, daß Oxytyramin am *Meerschweinchen* blutdruck*senkend* wirkt, während es z. B. den *Ratten*blutdruck steigert.

Extraktmengen, die am Rattenblutdruck der Wirksamkeit von etwa 100 γ Noradrenalin entsprachen, wurden in 7—8 cm Breite zur Chromatographie in Butanol-HCl aufgetragen. Am Ende der Laufzeit wurden an Hand eines Testchromatogramms die dem Noradrenalin bzw. Oxytyramin entsprechenden Zonen, wie in

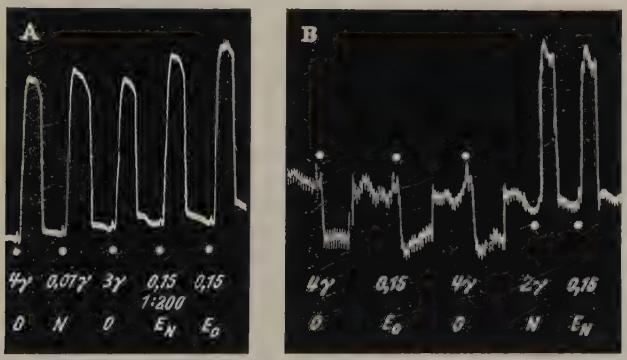


Abb. 4. Biologische Austestung des Eluates der *Noradrenalin-* und *Oxytyraminfraktion* eines *Milznerven*-Chromatogramms. *A. Rattenblutdruck. B. Meerschweinchenblutdruck. O* Oxytyramin. *N* Noradrenalin. E_O bzw. E_N Eluat der Oxytyramin- bzw. Noradrenalinfraktion des Milznervenextraktes (s. Text)

der Methodik beschrieben, ausgeschnitten und eluiert. Kontrollversuche mit Noradrenalin/Oxytyramingemischen hatten gezeigt, daß bei der Elution mit 20 bis 50%igen Verlusten zu rechnen ist, so daß die Werte der biologischen Austestung keine bindenden *quantitativen* Rückschlüsse erlauben.

Am *Ratten*blutdruck verursachten in dem Versuch der Abb. 4 *A* 0,15 cm³ des aus dem Chromatogramm eines Milznervenextraktes gewonnenen, 200fach verdünnten *Noradrenalin*-Eluates (E_N 1:200) eine gleichstarke Blutdruck*steigerung* wie 0,01 γ Noradrenalin. 0,15 cm³ des entsprechenden, unverdünnten *Oxytyramin*-Eluates hatten die Wirksamkeit von 4 γ Oxytyramin.

Am *Meerschweinchen*blutdruck hatten — bei 200fach höherer Dosierung — Nor-adrenalin (N) und Noradrenalin-Eluat (E_N) eine gleichstarke *pressorische* Wirkung. Die am Rattenblutdruck äquivalenten Mengen Oxytyramin (4 γ) und Oxytyramin-Eluat (0,15 cm²) hatten am *Meerschweinchen* eine gleichstarke *depressorische* Wirkung (Abb. 4 *B*).

Das *chromatographisch* als Oxytyramin charakterisierte Brenzcatechinderivat der Milznervenextrakte verhält sich demnach auch im Blutdrucktest an 2 verschiedenen Tierarten, von denen die eine mit Blutdruck*steigerung*, die andere mit Blutdruck*senkung* auf Oxytyramin reagiert, wie Oxytyramin.

3. Nachweis von Oxytyramin in Ganglienextrakten

Die Abb. 5 zeigt ein 2-dimensionales Chromatogramm, das mit einem aliquoten Teil eines Extraktes aus 100 g ggl. stellata vom Rind gewonnen wurde. Die aufgetragene Menge entsprach am Rattenblutdruck der Aktivität von 40 γ Noradrenalin. Wie die Versuche mit Milznerven, so zeigen auch diese Versuche mit Ganglien, daß der Extrakt in ungefähr gleichem Mengenverhältnis zwei Brenzcatechine enthält, von denen das eine sich chromatographisch wie *Noradrenalin*, das andere wie *Oxytyramin* verhält. Wiederum ergibt sich kein Anhaltspunkt für das Vorhandensein von Adrenalin, wenn auch in einigen Versuchen während des Besprühens mit Kaliumferricyanid eine ganz schwache Rötung in der Höhe des R_f-Wertes für Adrenalin auftrat.

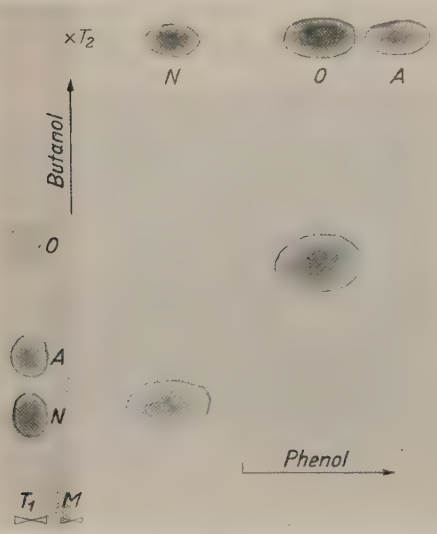


Abb. 5. Zweidimensionales Chromatogramm eines *Ganglienextraktes* (ggl. stellat.). Methodik und Beschriftung wie Abb. 3. *N* Nor-adrenalin. *O* Oxytyramin. *A* Adrenalin *M* Ganglienextrakt

In 2 Versuchen wurde das dem Oxytyramin entsprechende Eluat des Ganglienchromatogramms am Ratten- und Meerschweinchenblutdruck getestet: es wirkte an der *Ratte* blutdruck*steigernd*, am *Meerschweinchen* blutdruck*senkend*.

Es ergibt sich somit, daß auch sympathische Ganglien *Oxytyramin* in ungefähr gleicher Menge wie Noradrenalin enthalten.

4. Chromatographische Kontrollversuche mit Dopa, Dioxyphenylserin und Histamin

Um auszuschließen, daß bei der chromatographischen Differenzierung *Oxytyramin* vielleicht durch *Dopa*, die Muttersubstanz, oder durch *Dioxy-*

phenylserin[1], das unter rein *chemischen* Gesichtspunkten als Vorstufe des Noradrenalins in Frage käme (siehe hierzu jedoch HOLTZ und WESTERMANN), vorgetäuscht würde, und im biologischen Test am Meerschweinchen durch *Histamin*, das ebenfalls blutdrucksenkend wirkt und im Nerven und Ganglion vorkommt, haben wir das chromatographische Verhalten auch dieser Stoffe geprüft.

Mit Butanol-HCl als Lösungsmittel liegen die R_f-Werte von Dopa und Oxytyramin, wie bekannt (v. EULER), tatsächlich sehr nahe beieinander, in Phenol-HCl jedoch so weit auseinander

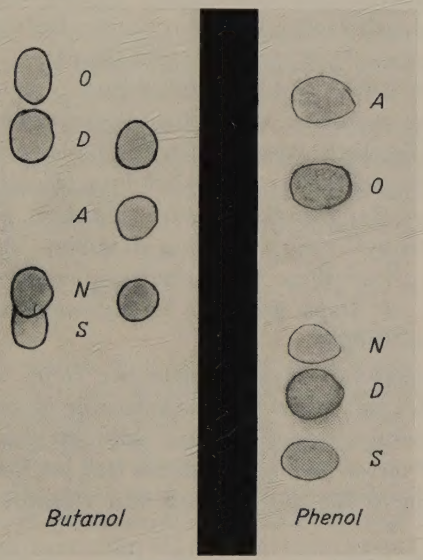


Abb. 6

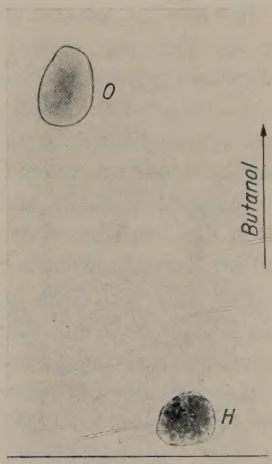


Abb. 7

Abb. 6. Kontroll-Chromatogramme mit *Adrenalin* (*A*), *Oxytyramin* (*O*), *Noradrenalin* (*N*), *Dopa* (*D*) und *Dioxy-phenylserin* (*S*) (je 10 γ) (siehe Text)

Abb. 7. Kontroll-Chromatogramm mit 10 γ *Oxytyramin* (*O*) und 10 γ *Histamin* (*H*). Solvens: Butanol-HCl. — Laufzeit 20 Std. Entwicklung mit 0,2%iger Ninhydrinlösung in n-Butanol (Histamin), anschließend mit Kaliumferricyanid (Oxytyramin)

und durch Noradrenalin getrennt, daß eine Verwechslung unmöglich ist (Abb. 6).

Das gleiche gilt für *Histamin*, das bei der Chromatographie mit Butanol einen weit geringeren R_f-Wert hat als Oxytyramin (Abb. 7). Zudem wurde in den Blutdruckversuchen am Meerschweinchen jede Histaminwirkung durch Verabfolgung eines Antihistaminicums ausgeschlossen.

Bemerkungen

1. Für die Biosynthese des *Noradrenalins*, des Überträgerstoffes sympathischer Nervenwirkungen, kommen *Oxytyramin* und *Dioxy-*

[1] Für die Überlassung von Dioxyphenylserin danken wir Herrn Prof. Dr. EHRHART, Farbwerke Hoechst.

phenylserin als Ausgangsmaterial in Frage. Im ersten Fall müßte eine OH-Gruppe an das β-C-Atom der Seitenkette gebracht werden, im zweiten Falle brauchte nur eine Decarboxylierung der Oxyaminosäure zum Amin stattzufinden. Mit dem in vorangegangenen Untersuchungen unseres Institutes (Holtz und Westermann) geführten Nachweis der *Dopadecarboxylase* in sympathischen Nerven und Ganglien wäre prinzipiell die ferment-chemische Möglichkeit der zweiten Reaktion im Nervengewebe selbst gegeben. Die erwähnten Untersuchungen hatten aber weiterhin gezeigt, daß Dioxyphenyl*serin* durch die Dopadecarboxylase der Nerven unvergleichlich schwächer decarboxyliert wird als das eigentliche Substrat des Fermentes, Dioxyphenyl*alanin* (Dopa).

Die hier vorgelegten eigenen Untersuchungen haben nun zwar weder für das Vorkommen von Dopa noch von Dioxyphenylserin einen Anhaltspunkt gegeben, jedoch papierchromatographisch und biologisch den Nachweis erbracht, daß die dopadecarboxylase- und noradrenalinhaltigen sympathischen Nerven und Ganglien *Oxytyramin* enthalten. Dieses kann aber nur aus einer Decarboxylierung von Dopa stammen. Die Befunde sprechen dafür, daß die Biosynthese des Noradrenalins über das durch die Dopadecarboxylase aus Dopa gebildete Oxytyramin erfolgt und im Nervengewebe selbst stattfindet.

Die *hohe* Aktivität der Dopadecarboxylase gegenüber *Dopa* würde verständlich machen, daß dieses sich nicht in nachweisbarer Menge im Nervengewebe findet; andererseits würde die *geringe* Affinität des Fermentes zu *Dioxyphenylserin* erwarten lassen, daß dieses sich im Nervengewebe nachweisen ließe, wenn es für die Bildung von Noradrenalin als Muttersubstanz diente.

2. Die zweite Stelle im Organismus, an der die Synthese der Sympathicusstoffe erfolgt, ist das *Nebennierenmark*. Auch hier ist — allerdings nur in *Schafs-* und *Rinder*nebennieren — *Oxytyramin* aufgefunden worden. Es soll etwa 2% des Gesamtgehaltes an biologisch wirksamen Brenzcatechinen ausmachen (Goodall; Shepherd u. West). Es ist deshalb besonders bemerkenswert, daß — wie unsere Untersuchungen gezeigt haben — das Oxytyramin der sympathischen *Nerven* und *Ganglien* zu einem weit höheren Anteil an dem Gesamtkatecholgehalt beteiligt ist, nämlich zu etwa 50%.

3. Das Vorkommen von *Adrenalin* in sympathischen Nerven und Ganglien stützt sich unseres Wissens bisher nur auf die Ergebnisse *biologischer* Differenzierung an Testobjekten, die wie Katzenblutdruck und Hühnercaecum eine verschiedene Empfindlichkeit gegenüber Adrenalin und Noradrenalin besitzen. Auf Grund solcher Auswertungen ergibt sich, daß Adrenalin zu etwa 2—3% am Gesamtkatecholgehalt beteiligt ist (s. z. B. v. Euler 1949). Unsere *chromatographischen* Untersuchungen haben keinen sicheren Anhaltspunkt für das Vorhandensein von

Adrenalin in Nerven- und Ganglienextrakten gegeben. Das könnte an der zu geringen Empfindlichkeit der Methode liegen. Andererseits halten wir es für möglich, daß das aus vergleichenden biologischen Austestungen erschlossene Vorkommen von 2—3% Adrenalin wenigstens zum Teil durch das zu etwa 50% vorhandene Oxytyramin vorgetäuscht werden kann.

Summary

1. The presence of *hydroxy-tyramine* in extracts from sympathetic nerves (splenic nerves) and sympathetic ganglia (stellata ganglia) is shown by paper-chromatography and pharmacological assay.

2. The hydroxy-tyramine *content* of the extracts is nearly 50% of the total amount of catechol-amines.

3. This result indicates that hydroxy-tyramine — formed by the l (—) dopadecarboxylase of the nervous tissue — is the *precursor* of the *nor-adrenaline* in sympathetic nerves and ganglia, and furthermore that the biosynthesis of nor-adrenaline from hydroxy-tyramine will take place in the nervous tissue itself.

Fräulein Christiane Bischof danke ich für ihre verständnisvolle Mitarbeit.

Literatur

Crawford, T. B., and A. S. Outschoorn: Brit. J. Pharmacol. **6**, 8 (1951). — v. Euler, U. S.: Arch. internat. Pharmacodynamie **77**, 477 (1948); Acta physiol. scand. (Stockh.) **19**, 207 (1949). — Goodall, Mc: Acta physiol. scand. (Stockh.) **24**, Suppl. 85 (1951). — Hamberg, U., and U. S. v. Euler: Acta chem. scand. (Copenh.) **4**, 1185 (1950). — Holtz, P., u. E. Westermann: Naturwissenschaften **1955**, 647; Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 538 (1956). — Holtz, P., u. K. Credner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **200**, 356 (1942). — James, W. O.: Nature (Lond.) **161**, 851 (1948). — Shepherd, D. M., and G. B. West: J. of Physiol. **120**, 15 (1953). — Vogt, M.: Brit. J. Pharmacol. **7**, 325 (1952).

Priv. Doz. Dr. H. J. Schümann, Frankfurt/M., Pharmakol. Institut d. Univ., Ludwig-Rehn-Str. 14